

Vedran Bogdanić

**Utjecaj broja odmrzavanja i zamrzavanja te
temperature pohrane krvne plazme na N-glikane
ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Olge Gornik.

Zahvaljujem se, u prvom redu, svojoj mentorici doc. dr. sc. Olgi Gornik na velikom angažmanu, stručnom vodstvu, savjetima, strpljenju i pomoći pri izradi ovoga rada kao i doktoru Gorniku na pomoći pri pribavljanju uzoraka potrebnih za eksperiment. Također se posebno želim zahvaliti doktorandima Tomi Keseru i Tamari Pavić na bezrezervnoj pomoći tijekom izrade rade, ugodnom društvu i korisnim savjetima tijekom rada u laboratoriju kao i svim djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju.

SADRŽAJ

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 1.1 | GLIKOZILACIJA I GLIKANI | 1 |
| 1.1.1 | GLIKOPROTEINI | 1 |
| 1.1.2 | TOPOLOGIJA GLIKOZILACIJE PROTEINA SISAVACA | 2 |
| 1.1.3 | REGULACIJA GLIKOZILACIJE | 3 |
| 1.1.4 | GLIKANIMA REGULIRANI STANIČNI MEHANIZMI | 5 |
| 1.1.5 | BOLESTI I GLIKOZILACIJA | 6 |
| 1.2 | ANALIZA GLIKANA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VRLO VISOKE DJELOTVORNOSTI BAZIRANE NA HIDROFILNIM INTERAKCIJAMA | 8 |
| 1.2.1 | ANALIZA GLIKANSKIH STRUKTURA | 8 |
| 2. | OBRAZLOŽENJE TEME | 9 |
| 3. | MATERIJALI I METODE | 11 |
| 3.1 | MATERIJALI | 11 |
| 3.1.1 | SOLI, KISELINE, LUŽINE | 11 |
| 3.1.2 | ORGANSKE KEMIJE | 11 |
| 3.1.3 | BIOLOŠKI MATERIJAL | 11 |
| 3.1.4 | OTOPINE I PUFERI | 12 |
| 3.1.5 | PRIBOR | 13 |
| 3.2 | METODA | 13 |
| 3.2.1 | PRIPREMA UZORAKA | 13 |
| 3.2.2 | ZAMRZAVANJE I ODMRZAVANJE KRVNE PLAZME | 14 |
| 3.2.3 | DEGLIKOZILACIJA PROTEINA | 15 |
| 3.2.3.1 | Priprema uzoraka i filter pločice od 10 kDa | 15 |
| 3.2.3.2 | Izolacija IgG-a pomoću protein G pločice | 15 |
| 3.2.3.3 | Vezanje IgG-a i njegovo ispiranje | 16 |
| 3.2.3.4 | Eluacija IgG-a | 16 |
| 3.2.3.5 | Regeneracija i čuvanje protein G pločice | 16 |
| 3.2.3.6 | Deglikozilacija proteina | 17 |
| 3.2.3.7 | Deglikozilacija | 17 |
| 3.2.4 | OBILJEŽAVANJE GLIKANA | 17 |
| 3.2.4.1 | Sakupljanje glikana | 17 |
| 3.2.4.2 | Priprema 2-AB otopine za obilježavanje glikana | 18 |
| 3.2.4.3 | Obilježavanje N-glikana derivatizacijom | 18 |
| 3.2.4.4 | Priprema GHP pločice | 18 |
| 3.2.4.5 | Pročišćavanje 2-AB obilježenih N-glikana | 18 |
| 3.2.4.6 | Eluiranje obilježenih N-glikana | 19 |
| 3.2.4.7 | Analiza derivata glikana HILIC-UPLC metodom (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography - Ultra Performance Liquid Chromatography) | 19 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 31 |
| 6. | LITERATURA | 32 |
| 7. | SAŽETAK | 36 |
| 8. | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | 38 |

1. UVOD

1.1 GLIKOZILACIJA I GLIKANI

1.1.1 GLIKOPROTEINI

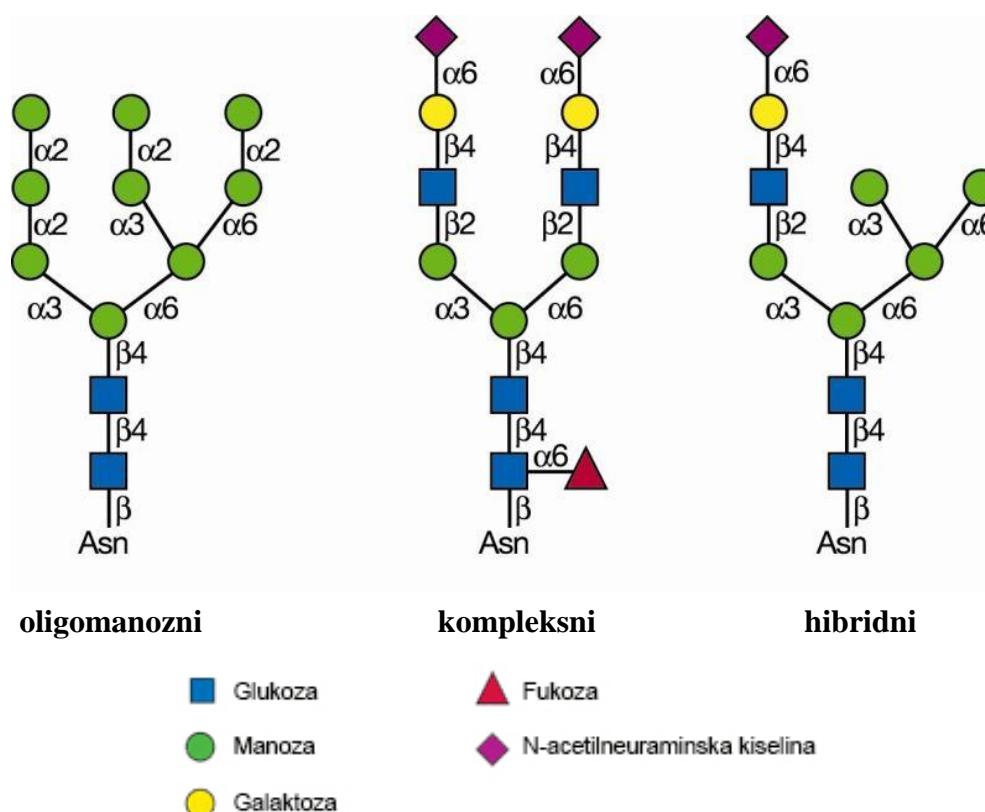
Glikoproteini su kompleksni glikokonjugati koji se sastoje od sržnog polipeptida i kovalentno vezanih glikanskih lanaca koji imaju vitalnu funkciju u raznim biološkim procesima poput stanične proliferacije, adhezije stanica, aktivacije receptora, prijenosa signala, diferencijacije, upale, imunskog odgovora i regeneracije tkiva (Hoshi i sur., 2012). Gotovo svi membranski i sekretorni proteini (Apweiler i sur., 1999), kao i mnogi citoplazmatski proteini (Hart i sur., 2007) su glikozilirani. Sekvenciranje cjelokupnog ljudskog genoma je bilo kolosalno postignuće, no otkriće da broj ljudskih gena ne nadmašuje znatno broj gena jednostaničnih organizama koji su neusporedivo jednostavniji od filogenetski naprednijih organizama je bilo iznenađenje i sasvim neočekivano otkriće budući da je ljudski organizam evidentno daleko kompleksniji od obične bakterije pa se moglo pogrešno pretpostaviti da se kompleksnost bazira isključivo na broju gena organizma. Ovo otkriće dovelo je do promjene paradigme i bitno drugačijeg pogleda na gene i njima kodirane proteine koji obavljaju veliki broj jednostavnih procesa u kompleksnom i visoko rereguliranom eukariotskom organizmu u kojem glikozilacija, ali i ostale postranslacijske modifikacije, epigenetski faktori, nekodirajuća DNK, ali brojni i dalje nedovoljno istraženi faktori grade punu složenost života na zemlji.

Pretpostavka da je funkcija svakog proteina određena njegovom strukturom, koja je pak definirana redoslijedom nukleotida u korespondirajućem genu, i dalje je središnja dogma biologije, no u svijetlu novih otkrića znamo da je struktura glikana određena kompleksnim međudjelovanjem svih proteina koji sudjeluju u procesu sinteze glikana, genetskim polimorfizmima uključenih gena, regulacijom genske ekspresije i aktivnošću enzima tijekom procesa glikozilacije koji zajednički određuju konačnu strukturu glikana (Gornik i sur., 2011). I još mnogi dodatni mehanizmi poput primjerice specifične intracelularne lokalizacije procesa ili kompeticija sa endogenim akceptorima supstrata i varijabilna dostupnost monosaharidnih supstrata također mogu utjecati na konačnu strukturu glikana (Ohtsubo i Marth, 2006). Karakterizacija i određivanje glikozilacije plazmatskih proteina je izazovan zadatak zbog heterogenosti samih glikanskih struktura, ali i dodatno otežan sličnim fizikalno-kemijskim karakteristikama glikana pa su glavne metode analize glikana HILIC (kromatografija bazirana na hidrofilnim interakcijama) u obliku tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, CE

(kapilarna elektroforeza), MS (masena spektrometrija). Analizi N-glikana obično prethodi enzimatsko kidanje glikanske strukture s proteina pomoću peptid N-glikozidaze F, označavanje oslobođenih glikana fluorescentnom oznakom poput 2-aminobenzamida i separacija kromatografskom metodom.

1.1.2 TOPOLOGIJA GLIKOZILACIJE PROTEINA SISAVACA

U procesima glikozilacije kod sisavaca sudjeluje ukupno devet monosaharida koji nastaju visoko konzerviranim biosintetskim putevima iz šećera normalno prisutnih u hrani. Nije zapaženo da suplementacija prehrane određenim monosaharidima pridonosi zdravlju ili terapiji bolesti, osim u slučaju nekih od rijetkih genetskih bolesti glikozilacije koje su prvotno nazvane glikoproteinski sindromi ugljikohidratne deficijencije, a danas kongenitalni poremećaji glikozilacije (CDG). Pa je tako kod primjerice bolesti deficijencije manozna-fosfat izomeraze (MPI-CDG) dnevnom suplementacijom manoze moguće eliminirati simptome bolesti koji na sreću zahvaćaju samo gastrointestinalni trakt za razliku od defekta fosfomanomutaze (PMM2-CDG) koji uključuje i teške neurološke defekte što je možda neobično da usprkos bliskosti dvije reakcije u biosintezi manoze-1-fosfata svjedočimo drastično različitim simptomima (Thierry 2011). Strukturalna raznovrsnost i razgranatost N-glikoma sisavaca nastaje tijekom njihove sinteze koja započinje na membrani endoplazmatskog retikuluma sintezom GlcNAc2Man5 na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma, zatim dolazi do translokacije na luminalnu stranu ER i nastavka sinteze na lipidnom nosaču dolikol-pirofosfata. Svi N-glikani imaju istu glikansku jezgru $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ i klasificiramo ih u tri glavne skupine: oligomanoznu jer su samo manozni ostaci vezani na glikansku jezgru; kompleksnu skupinu u kojoj od dvije ili više grana, barem jedna biva sintetizirana acetilglukozaminiltransferazama te hibridnu skupinu kod koje su ostaci manoze vezani samo na $\text{Man}\alpha 1-6$ ruku šećerne baze i dodatna jedna ili dvije antene sa raznim šećernim ostacima na $\text{Man}\alpha 1-3$ ruku (Gornik i Lauc, 2008).



Slika 1: Tipovi N- vezanih oligosaharida: oligomanozni, kompleksni i hibridni. Slika je preuzeta sa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Glikozilacijom proteina nastaju N-vezani glikoproteini, ali i O-vezani glikoproteini i glikozaminoglikani (proteoglikani). Također je poznata i glikozilacija lipida kojom nastaju glikolipidi, uključujući i gangliozide povezane sa sijalinskom kiselinom (Maccioni i sur., 2002). N-vezani glikani nastaju vezanjem na asparaginski ostatak proteina u sekvenci oblika Asn-X-Ser/Thr, dok su O-vezani glikani spojeni na serinski ili treoninski ostatak (Yan i sur., 2005). Kod glikozaminoglikana, odnosno proteoglikana, također dolazi do povezivanja na serinski ili treoninski ostatak, no posebnost glikozaminoglikana je u tome što su linearni, nastaju posebnim biosintetskim putem i često su visokosulfurirani (Esko i sur., 2002). Zanimljivo je spomenuti i glikozaminoglikan hijaluronan odnosno hijaluronsku kiselinu koja je specifična po tome što nije sulfurirana i nastaje u plazmatskoj membrani, a ne u Golgijevom aparatu i kao bitna komponenta ekstracelularnog matriksa doprinosi proliferaciji i migraciji stanica (Weigel i sur., 1997). Iznimka od pravila glikozilacije je glikozilacija lizinskih, triptofanskih i tirozinskih ostataka pojedinih proteina, primjerice prvog otkrivenog glikoproteina glikogena na čiji je sržni protein glikogenin vezano i do 30 000 molekula glukoze. Osim inherentne varijabilnosti, glikanske strukture mogu biti i dodatno modificirane acetiltransferazama i sulfotransferazama koje dodaju acetilne odnosno sulfo

skupine na određene šećerne ostatke u glikanima i pritom moduliraju funkciju kroz modifikaciju strukture (Fukuda i sur., 2001).

Glikozilacija nije bitna samo u sekretornom biosintetskom putu, nego i kod mnogih intracelularnih, pa i nuklearnih proteina. Primjerice kod većine eukariotskih organizama je nađen O-GlcNac (N-acetilglukozamin) vezan na serinski ili treoninski ostatak. Regulirana citoplazmatska N-acetilglukozaminidaza opetovano veže O-GlcNac na predviđena mjesta na proteinima, ili te aminokiselinske ostatke ostavlja slobodne za primjerice fosforilaciju. Ta visoko regulirana posttranslacijska modifikacija direktno regulira transkripciju i translaciju preko regulacije aktivnosti transkripcijskih faktora (Zachara i sur., 2004). Važno je razlikovati glukuronidaciju od glikozilacije sekretornih i citoplazmatskih proteina. Glukuronidacija je naime proces vezanja samo jedne molekule glukuronske kiseline najčešće na ksenobiotike kojom nastaju glukuronidi koji su tada tipično solubilniji od ishodišne molekule pa lakše bivaju eliminirani iz organizma urinom (Tukey, 2000). Također treba razlikovati i glikaciju koja označava neenzimsko i nasumično vezanje šećera povezano s određenim bolestima budući da dugo živuće molekule mogu akumulirati znatna oštećenja vezanjem najčešće fruktoze i galaktoze koje imaju veći potencijal vezanja od recimo glukoze. Primjerice kod dijabetesa se kao pouzdan marker dugoročne regulacije koncentracije glukoze u krvi pokazao glicirani hemoglobin HbA1c čija povišena vrijednost ukazuje na lošu kontrolu dijabetesa.

1.1.3 REGULACIJA GLIKOZILACIJE

Glikoziltransferaze stvaraju glikane, a glukozidaze kidaju glikanske veze, no međudjelovanje oba dva tipa enzima je bitno za konačnu strukturu glikana. Sljedeći korak u glikozilaciji nije nasumičan i nepredvidiv nego često ovisi o već stvorenoj glikanskoj strukturi (Schachter, 2000). Postoji velik broj izoenzima glikoziltransferaza i upravo na tome se bazira lepeza različitih glikanskih struktura. Glikozilacija u sekretornom biosintetskom putu je dinamičan proces moduliran kroz više mehanizama koji utječu na ekspresiju i strukturu glikoziltransferaza i glukozidaza, no nisu još uvijek do kraja razjašnjeni. Ekspresija glikana je regulirana na posttranskripcijskoj i posttranslacijskoj razini, no bez promjene enzimatske aktivnosti jer su i glikoziltransferaze i glukozidaze konstitutivno aktivne. Neke i same moraju biti glikozilirane da bi bile aktivne što pretpostavlja zapravo mehanizam katalitičke regulacije. No, i pristup supstratima može utjecati na stvaranje glikana kroz različitu unutarstaničnu lokalizaciju glikoziltransferaza i glukozidaza. Primjerice gubitkom nekih šaperona i višeproteinskih kompleksa odgovornih za transport glikoziltransferaza između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata uzrokuje znatne promjene u glikomu (Wu i

sur., 2004). Još jedan mogući način regulacije je fosforilacija njihovih citoplazmatskih repova što bi moglo dovesti do modulacije dostupnosti supstrata. Tako primjerice oksogvanin DNK glikozilaza (OGG1) inicira popravak 8-oksogvanina koji je ozbiljno oksidativno oštećenje DNK, a čije djelovanje je modulirano fosforilacijom (Hu i sur., 2005). Među glikoziltransferazama koje stvaraju različite glikozidne veze postoji kompeticija za supstrat, pa tako postoje glikoziltransferaze različitog afiniteta za nukleotidni donor šećera, a jednaku specifičnost za akceptor supstrata; ali i one različitog afiniteta za akceptor pa ovisno o tome koji enzim prvi modificira supstrat, može usmjeriti glikozilaciju bilo u jednom, bilo u drugom smjeru (Priatel i sur., 2000). Mogućnost rapidnog stvaranja raznolikih novih struktura bez promjena u genomu je velika evolucijska prednost viših eukariota sa niskim reproduktivnim potencijalom u usporedbi sa virusima pa i bakterijama (Varki, 2006). Široku kontrolu nad sintezom glikana može se postići kontrolom biosinteze i raspoloživosti nukleotidnih donora šećera-blokada njihove biosinteze ili gubitak specifičnih transportera iz endoplazmatkog retikuluma ili Golgijevog aparata mogu onemogućiti stvaranje glikana koji sadrže primjerice fukozu ili sijalinsku kiselinu (Schwarzkopf i sur., 2002). Aktivirane nukleotidne šećere potrebno je iz citoplazme transportirati do Golgijevog aparata antiportom pomoću serije energetski neovisnih transportera koji uvoze nukleozid difosfate, a izvoze nukleozid monofosfate natrag u citoplazmu (Liu i sur., 2010). Ovakvi transporteri mogu biti visoko specifični i prebacivati samo jedan supstrat ili selektivni prema nekoliko supstrata koji mogu graditi i različite tipove glikana (Caffaro i sur., 2008).

1.1.4 GLIKANIMA REGULIRANI STANIČNI MEHANIZMI

Glikani direktno sudjeluju u mnogim staničnim mehanizmima vezanjem na lektine i steričkom modulacijom interakcija. Danas su poznate mnoge uloge glikana, a neke su nastale rano u evoluciji višestaničnih organizama i zanimljivije među njima su navedene u nastavku teksta. Vezanje lektina može potaknuti adheziju među stanicama kod primitivnih višestaničnih organizama poput spužvi. Primjerice prosijavanjem spužve na pojedinačne stanice, one su u stanju ponovno se povezati te oformiti intaktni izvorni organizam. Funkciju lektina u adheziji stanica sisavaca može se zorno predložiti preko selektina odnosno uloge njihovih glikanskih liganda u vezanju leukocita, dakle u homeostazi imunološkog sustava i upalnom odgovoru (Rosen, 2004).

Više studija je potvrdilo da selektini sudjeluju u takozvanom kotrljanju neutrofila, monocita i limfocita po endotelu koje prethodi adheziji i dijapedezi stanice prema mjestu upale. Selektini

se svojom aminoterminalnom ekstracelularnom lektinskom domenom vežu na specifične glikanske ligande i ova interakcija je specifična za leukocite i vaskularni endotel (Tedder i sur., 1995). Glikozilacija je također bitna za razvoj embrija jer nepravilna ili nepotpuna glikozilacija često dovodi do bolesti, a gubitkom nekih glikana onemogućena je i sama oplodnja (Okabe 2013). Enzimi potrebni za stvaranje nekih glikana poput kompleksnog i hibridnog tipa N-glikana kao i nekih O-glikana su se pokazali nepotrebni za uspješnu fertilizaciju. To nas navodi na zaključak da su glikoproteini bitni za proces fertilizacije, ali ne i presudni (Williams i sur., 2007; Shi i sur., 2004).

Sposobnost lektina sisavaca da razlikuju stanice vlastitog organizma od uljeza poput bakterija i gljivica također se temelji na glikanima, pa tako urođeni imunosni sustav aktivacijom Toll-like receptora raspoznaje bakterijske glikanske ligande (Barton i Medzhitov, 2003). Skoro da i nema receptora koji na neki način ne uključuje glikoproteine, bilo da su same domene receptora glikozilirane, ligandi koji se na njih vežu ili pak koregulacijske molekule potrebne za funkcioniranje receptora. Nadalje, glikani stvoreni u Golgijevom aparatu moduliraju endocitozu membranskih glikoproteina i tako mogu modulirati ekspresiju samih receptora i staničnu singalizaciju (Partridge i sur., 2004). Također je zanimljivo spomenuti da i sve molekule imunoglobulina G sadrže N-glikane koju moduliraju njihovu biološku aktivnost. U prosjeku preko 95% IgG-a sadrži sržnu fukozu koja je svojevrsni osigurač koji onemogućava protutijelom aktiviranu staničnu toksičnost. Dok manjem broju IgG molekula ta sržna fukoza nedostaje te su u tom slučaju i do 100 puta efikasnije u iniciranju antitijelom aktivirane stanične toksičnosti, a upravo to saznanje je iskorišteno u stvaranju terapijskih monoklonskih antitijela (Gornik i sur., 2012; Shan i sur., 2012). Glikani prisutni u organizmu mogu također služiti kao autoantigeni odnosno endogeni ligandi za CD1d u stvaranju i selekciji prirodnih stanica ubojica (NKT stanica) u timusu. Budući da određene lizosomske bolesti nakupljanja dovode do izostanka ili oslabljenog djelovanja prirodnih stanica ubojica, znamo da su lizosomima obrađeni i razgrađeni glikoproteini bitni za normalno funkcioniranje NKT stanica (Zhou i sur., 2004). Također, velik broj endogenih glikana sudjeluje u vezanju T-limfocita na veliki kompleks tkivne kompatibilnosti (MHC). Promjenom ponekad i jednog šećernog ostatka na glikanskoj strukturi moguće je znatno utjecati na odgovor T stanica (Carbone i Gleeson, 1997).

1.1.5 BOLESTI I GLIKOZILACIJA

Obično pod bolestima glikozilacije podrazumijevamo raznorazne poremećaje koji su

posljedica nepravilne i nepotpune glikozilacije kao anaboličkog procesa. Radi se o nasljednim bolestima koje obuhvaćaju i poremećaje i N- i O- glikozilacije. Kako broj opisanih bolesti raste, dogovorena je i logična nomenklatura bolesti: ime mutiranog gena + CDG što u prijevodu znači kongenitalni poremećaj glikozilacije.

Defekti endocitoze i lizosomalne razgradnje glikana također spadaju pod bolesti glikozilacije u širem smislu te riječi. Primjerice Gaucherova bolest nakupljanja glukocerebrozida, Sandhoffova bolest sa disfunkcionalnim HEXB genom rezultira nakupljanjem GM2 gangliosida zbog nedostatka beta heksoaminidaze tipa A i B; ili Tay-Sachsova bolest deficijencije heksoaminidaze tipa A sve redom nastaju zbog greške u katabolizmu glikana što dovodi do gomilanja nerazgrađenih glikana i njihovog nakupljanja u stanici. Te bolesti su progresivne i još uvijek nisu razvijeni uspješni terapijski pristupi za liječenje, no moguća je već i prenatalna dijagnostika u prvom trimestru.

Jedna od prvih otkrivenih bolesti glikozilacije je bila mukopolidoza tip 2 poznata i kao I-stanična bolest zbog nastanka inkluzijskih tjelešaca kod koje izostaje uvođenje manoze-6-fosfata u N-glikane u Golgijevom aparatu (Cathey i sur., 2010). Ta modifikacija usmjerava hidrolaze u lizosome, a nepostojanje tog signala dovodi do narušenog katabolizma proteina (Kornfeld i Kornfeld, 1985). Sve više kongenitalnih bolesti glikozilacije koje više ne obuhvaćaju samo ozbiljne morfološke i metaboličke defekte biva otkriveno što otvara prostor novim dijagnostičkim metodama i terapijskim pristupima. Koliko ukupno ima bolesti glikozilacije još uvijek ne možemo sa sigurnošću reći jer su analitičke metode detekcije i dalje nedovoljno razvijene. Detekcija ovih bolesti započela je sa ozbiljnijim sindromima kod kojih je nefunkcionalna neka od ranih karika u procesu sinteze glikana i za njih još uvijek uglavnom ne postoje uspješne terapije. Istraživanja na životinjama su nam otkrila funkcije svih enzima koji sudjeluju u glikozilaciji i opće pravilo je: što je kasniji korak sinteze glikana inaktiviran ili defektan, to su najčešće manje izražene morfološke promjene koje i ne moraju rezultirati letalnim ishodom.

Najčešća bolest glikozilacije je PMM2 CDG odnosno deficijencija fosfomanomutaze 2 (Manoza-6-P → Manoza-1-P) i do danas je otkriveno preko 100 mutacija u tom genu. Delecija tog gena na životinjskim modelima nije spojiva sa životom, pa se kod ove bolesti radi o većim ili manjim nedostacima aktivnosti enzima. Terapija nažalost još uvijek ne postoji, no radi se na otkrivanju PMM2 aktivatora, nadomještanju PMM2 i drugim pristupima koji obećavaju.

Do sada je postignut veliki napredak u otkrivanju kongenitalnih bolesti glikozilacije, no taj progres izostaje na području razvoja uspješnih terapija za ove bolesti. Nove metode rane

dijagnostike, poznavanje molekulskih osnova bolesti kao i visokoprotočne metode analize sigurno će ubrzati razvoj ciljanih terapija za već poznate kao i novootkrivene bolesti glikozilacije.

1.2 ANALIZA GLIKANA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VRLO VISOKE DJELOTVORNOSTI BAZIRANE NA HIDROFILNIM INTERAKCIJAMA

1.2.1 ANALIZA GLIKANSKIH STRUKTURA

Zbog visoke polarnosti i hidrofilnosti, sličnih kemijskih i fizikalnih svojstava među glikanima, kompleksne strukture, ali i nepostojanja pogodnih kromofora za UV detekciju, analiza glikana je donedavno bila zahtjevna zbog nezadovoljavajuće separacije analita klasičnom kromatografijom visoke djelotvornosti i slabe osjetljivosti raspoloživih metoda. Razvojem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koja se zasniva na hidrofilnim interakcijama (HILIC – engl. Hydrophilic Interaction High Performance Liquid Chromatography) postala je moguća brza i efikasna kvantitativna analiza glikana (Buszewski i Noga, 2012). HILIC se pokazao kao izuzetno moćna metoda za razdvajanje polarnih analita koja omogućava drugačiju selektivnost u usporedbi sa klasičnom kromatografijom obrnutih faza (Yunsheng, 2008). HILIC je vrsta razdjelne kromatografije koja istovremeno ima obilježja kromatografije normalnih i obrnutih faza. Kao i kod kromatografije normalnih faza, stacionarna faza je polarnija od mobilne faze. Kao stacionarna faza najčešće služi silikagel modificiran polarnim funkcionalnim skupinama kao što su amino, amidna ili cijano skupina, a mobilne faze mješavine su otapala sa visokim udjelom hidrofobnog organskog otapala (Bieke i sur., 2008). HILIC se koristi za odvajanje različitih analita uključujući biološke molekule iz složenih matrica, koje se međusobno razlikuju po polarnosti i posebno je pogodan za separaciju glikana. Kod standardne HILIC kromatografije iz kolone prvo izlaze hidrofobniji analiti, a zatim oni polarniji i hidrofilniji koji se jače vežu za hidrofilnu stacionarnu fazu (Buszewski i Noga, 2012; Pučić i Baković, 2012). Za analizu glikana se najčešće koristi HILIC jer HILIC kolone jače vežu i bolje razlučuju jako polarne analite poput glikana. N-glikani enzimatski odvojeni sa glikoproteina uzoraka plazme PNG-azom F, obilježavaju se fluorescentnim markerom 2-aminobenzamidom te se potom razdvajaju HILIC-om (Ahn i sur. 2010). 2-aminobenzamid se pokazao kao izuzetno dobar fluorescentni marker visoke osjetljivosti i u niskim pikomolarnim koncentracijama (Wing i sur., 2001).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Većina svih poznatih proteina je glikozilirana i osim što glikanske strukture doprinose strukturnoj kompleksnosti, imaju i važnu ulogu u brojnim procesima u organizmu koji dolaze u fokus moderne biologije i medicine. Varijabilnost glikozilacije na razini populacije je neobično velika, no u pojedincu je kompozicija glikoma zapanjujuće stabilna usprkos nepostojanju genetičkog predloška. Do promjena u glikozilaciji proteina dolazi u brojnim bolestima i već su identificirani mnogi glikobiomarkeri koji će nedvojbeno razvojem područja postati značajni, kako u dijagnostici, tako i u terapiji uvidom u biološku važnost glikomodifikacija (Alavi i sur., 2008). Recentni razvoj modernih analitičkih tehnika omogućio je visokoprotocnu analizu glikana velikog broja uzoraka, usprkos njihovoj fizikalno-kemijskoj sličnosti te poteškoćama pri razdvajanju analita koje iz toga proizlaze.

Analiza glikoma stoga postaje sve važnije područje istraživanja koja podrazumijeva baratanje ogromnim brojem uzoraka u populacijskim studijama, kohortnim studijama te cjelogenomskim asocijacijskim studijama koje uključuju velik broj ljudi iz različitih dijelova svijeta. S obzirom na navedeno, od velike je važnosti istražiti kako opetovano zamrzavanje i varijabilni uvjeti tijekom transporta uzoraka, koji često bivaju analizirani i više puta, mogu utjecati na stabilnost glikanskih struktura i rezultate same analize glikozilacije. Poznavanje ovog utjecaja važno je kako bi se odredila ograničenja i mogućnosti direktnog uspoređivanja rezultata analize glikoma u slučaju kada predanalitički koraci nisu jasno definirani. Osim istraživanja utjecaja predanalitičkih čimbenika na N-glikozilaciju ukupnih proteina plazme, u radu će se proučavati i utjecaj tih čimbenika na rezultate analize N-glikozilacije imunoglobulina G (IgG), kao jednog od najistraživanijih plazmatskih proteina čija je funkcija, te utjecaj modifikacije glikana na istu, dobro poznat (Vidi Slika 2).

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti utjecaj ponavljanja odmrzavanja i zamrzavanja uzoraka plazme, različitih temperatura čuvanja tih uzoraka te načina odmrzavanja krvne plazme na analizu glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a kao proteina od posebnog interesa metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koja se temelji na hidrofilnim interakcijama - HILIC (Cuhadar i sur. 2013). To je jedna od tri suvremene metode analize glikana, uz kapilarnu elektroforezu i spektrometriju masa, a omogućava analizu velikog broja uzoraka (Pabst i Altmann, 2011).

Specifični ciljevi rada:

- odvojiti plazmu iz pune krvi dobrovoljaca
- zamrzavati i odmrzavati uzorke krvne plazme pri različitim uvjetima i različit broj puta
- analizirati glikozilaciju ukupnih plazmatskih proteina iz navedenih uzoraka plazme tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti bazirane na hidrofilnim interakcijama
- iz plazme izolirati imunoglobulin G
- analizirati glikozilaciju imunoglobulina G iz navedenih uzoraka plazme tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti bazirane na hidrofilnim interakcijama
- odrediti utjecaj temperature, broja i načina odmrzavanja na rezultate analize glikanskih struktura plazmatskih proteina te IgG-a

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 SOLI, KISELINE, LUŽINE

| | |
|------------------------|--------------|
| Amonij bikarbonat | Sigma |
| Natrij klorid | SigmaAldrich |
| Klorovodična kiselina | Kemika |
| Formijatna kiselina | J.T.Baker |
| Ledena octena kiselina | Merck |
| Kalij klorid | SigmaAldrich |
| Dinatrij fosfat | SigmaAldrich |
| Kalij dihidrogenfosfat | SigmaAldrich |

3.1.2 ORGANSKE KEMIČALIJE

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| Acetonitril | J.T.Baker |
| Etanol | SigmaAldrich |
| TRIS (hidroksimetilaminometan) | SigmaAldrich |
| DMSO (dimetilsulfoksid) | Fluka |
| 1,33% SDS (natrij dodecil sulfat) | Invitrogen |
| 4% Igepal | SigmaAldrich |

3.1.3 BIOLOŠKI MATERIJAL

| | |
|-----------|---------|
| PNG-aza F | Prozyme |
|-----------|---------|

3.1.4 OTOPINE I PUFERI

| | |
|---|---|
| 10xPBS pH=6,6 | Za 1 L pufera; 80.028 g NaCl, 13.832 g Na ₂ HPO ₄ , 2.964 g KH ₂ PO ₄ , 1.976 g KCl te sve otopiti u miliQ H ₂ O. Nakon miješanja otopinu filtrirati i ispitati pH. |
| 5xPBS pH=7,4 | Za 1 L pufera: 500 ml 10xPBS uz dodatak vode do 0.9 L; podesiti pH s NaOH i onda nadopuniti do 1 L. |
| 1XPBS pH=7,4 | Za 1 L pufera: 100 ml 10xPBS uz dodatak vode do 0.9 L; podesiti pH s NaOH i onda nadopuniti do 1 L. |
| Eluacijski pufer (0.1M formijatna kiselina) pH=2,5 | Za 500 ml pufera: 1.885 ml formijatne kiseline dodaje se u 500 ml miliQH ₂ O. |
| Neutralizacijski pufer (1M amonij bikarbonat) | Za 100 ml pufera: 7.906 g amonij bikarbonata otapa se u 100 ml miliQ H ₂ O |
| Storage pufer (20% EtOH u 20mM TRIS + 0.1M NaCl) pH=7.4 | Za 500 ml pufera: 100 ml EtOH, 1.21 g TRIS, 2.922 g NaCl, doliti miliQ H ₂ O do 350 ml te podesiti pH na 7.4 pomoću HCl. Doliti H ₂ O do 500 ml te otopinu filtrirati. |
| 1,33% SDS | Za 6 ml: 2 ml 2% SDS-a potrebno je pomiješati sa 4 ml miliQ H ₂ O. |
| Otopina za obilježavanje glikana: 2-aminobenzamid (SigmaAldrich) 2-pikolin boran (SigmaAldrich) | Za 100 uzoraka: otopiti 0.048 g 2-aminobenzamida i 0.112 g 2-pikolinborata u 2,5 ml 30% otopine octene kiseline u DMSO. |

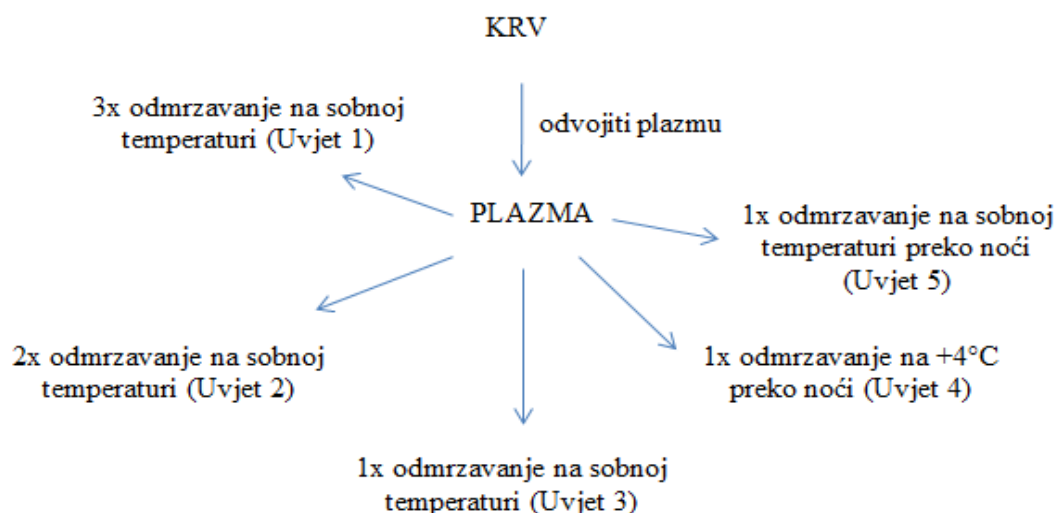
3.1.5 PRIBOR

| | |
|--|--|
| Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 2 ml zapremnine, za 96 uzoraka | Waters |
| Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml zapremnine, za 96 uzoraka | Waters |
| Vacuum manifold | Pall Corporation |
| Mikropipete (obične i multikanalne), sa nastavcima za automatsku pipetu | Ranin |
| Protein G pločica | |
| Filter pločica od 1 ml | AcroPrep 96 GHP 0.45 µm, Pall |
| 10 kDa filter pločica | Pall |
| PCR pločice | Frame Star 96-wellnonskirted PCR plate |
| Shaker | IKA [®] - Schüttler MTS 4 |
| Centrifuga | Eppendorf 5804 |
| pH metar | MetllerToledo |
| Vaga | MetllerToledo |
| Filteri od 0.2 µm | Carl Roth |

3.2 METODA

3.2.1 PRIPREMA UZORAKA

Krv je od dobrovoljnih davatelja uzeta venepunkcijom na antikoagulans upotrebom sterilne igle i spremnika odgovarajuće zapremnine sa podtlakom. Uzorci su zatim centrifugirani na 2500 okretaja tijekom 10 minuta kako bi se postigla potpuna sedimentacija i izdvajanje krvne plazme koja se prenosi u istu veću epruvetu kako bi se dobio homogeni uzorak. Plazma se zatim razdjeljuje u prethodno označene ependorfe (vidi 3.2.2.). Svaki uzorak zatim prolazi kroz eksperimentom predodređen broj zamrzavanja i odmrzavanja na preddefiniranim temperaturama i vremenskim intervalima (vidi Slika 2) čemu slijedi analiza glikozilacije plazmatskih proteina.



Slika 2: Shema plana zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka

3.2.2 ZAMRZAVANJE I ODMRZAVANJE KRVNE PLAZME

Krvna plazma se raspodjeljuje u 50 prethodno označenih ependorfica jer se uzorci tretiraju na pet različitih načina (1, 2, 3, 4, 5). Svaki pokus radi se u pentaplikatu. Uzorci se pohranjuju na temperaturama od -20°C i -80°C .

Protokol odmrzavanja:

1. dan → uzorci (1) se odmrzavaju na sobnoj temperaturi i vraćaju natrag na zamrzavanje na odgovarajuću temperaturu -20°C ili -80°C .
2. dan → uzorci (1) i (2) se odmrzavaju na sobnoj temperaturi i vraćaju natrag na zamrzavanje na odgovarajuću temperaturu -20°C ili -80°C .
 → uzorci (4) odmrzavaju se preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$
 → uzorci (5) odmrzavaju se preko noći na sobnoj temperaturi
3. dan → uzorci (1), (2) i (3) odmrzavaju se na sobnoj temperaturi

3.2.3 DEGLIKOZILACIJA PROTEINA

3.2.3.1 Priprema uzoraka i filter pločice od 10 kDa

Tijekom rada s uzorcima plazme poželjno je sve korake raditi u digestoru. Od ključne je važnosti također izbjeći unakrsnu kontaminaciju tijekom rada s velikim brojem uzoraka te je potrebno mijenjati nastavke za automatsku pipetu pri manipulaciji svakim novim uzorkom. 1.33% SDS-u (natrij dodecil sulfat), 4% Igepal-u te 1xPBS-u (fosfatni pufer) treba dati vremena da se zagriju na sobnu temperaturu. Na 10 kDa filter pločici potrebno je isprati svaku jažicu dva puta sa po 100 μ L ultra pročišćene vode koristeći 300 μ L nastavke za pipetu te pločicu isprazniti pomoću vakuuma pazeći pritom da vakuum ne prelazi 10 inHg.

Odmrznute uzorke plazme centrifugira se 3 minute na 13400 okretaja u minuti. U čistu pločicu jažica zapremnine 350 μ L otpipetira se 10 μ L plazma standarda u kontrolne jažice koristeći nastavke za pipetu od 200 μ L. Zatim se otpipetira po 10 μ L uzoraka plazme u jažice na istu pločicu zapremnine 350 μ L koristeći nastavke za pipetu sa filterom od 200 μ L. 90 μ L ultra pročišćene vode dodaje se u jažice te promiješa pipetom te se korištenjem istog nastavka ukupni volumen od 100 μ L prenosi u 10kDa filter pločicu koja se zatim centrifugira 20 minuta na 3500 okretaja u minuti. Potom se dodaje 100 μ L ultra pročišćene vode svakom uzorku i ponavlja se centrifugiranje 10 kDa filter pločice 20 minuta na 3500 okretaja u minuti.

3.2.3.2 Izolacija IgG-a pomoću protein G pločice

Odmrznuti uzorci plazme centrifugiraju se 3 minute na 13 400 okretaja u minuti. U pločicu za sakupljanje uzoraka zapremnine 1 ml otpipetira se 100 μ L plazme po uzorku. Svakom uzorku se dodaje 700 μ L 1xPBS-a. Nakon razrjeđenja uzorci se prenose na AcroPrep GHP filter pločicu zapremnine 1 ml sa veličinom pora od 0.45 μ m te se uz primjenu vakuum pumpe filtrat sakuplja u pločicu za sakupljanje uzoraka od 2 ml. Uzorci se filtriraju kroz AcroPrep filter pločicu kako bi se uklonile eventualno prisutne veće čestice iz plazme koje bi mogle uzrokovati začepljenje protein G pločice. Miješaju se na tresilici do stavljanja na pločicu sa proteinom G. Kako bi protein G pločica ostala što dulje funkcionalna i kako bi se mogla višestruko koristiti, stavlja se pufer za čuvanje pločice koji je prije ponovne upotrebe potrebno baciti. Nakon toga pločica se ispiri sa 2 ml miliQ H₂O i 2 ml 1xPBS-a kako bi se omogućilo pročišćavanje od mehaničkih nečistoća i izotonizacija. Nakon toga dodaje se 1 ml 0.1M

formijatne kiseline da bi se uklonio eventualno zaostali IgG iz prethodnih ispitivanja. Kako bi se postigla neutralizacija kiselog medija nakon dodatka formijatne kiseline dodaje se 2 ml 10xPBS-a. Naposljetku se dodaje 4 ml 1xPBS-a kako bi se pločica ekvibrilirala. Nakon svakog koraka i dodavanja otopina, pločica je ispražnjena uz pomoć vakuum ručnog uređaja pri čemu vakuum nije prelazio 17 inHg da se pločica ne bi oštetila.

3.2.3.3 Vezanje IgG-a i njegovo ispiranje

Filtrirani uzorci plazme skinu se s tresilice i pomoću višekanalne pipete se prenose na protein G pločicu. Prilikom nanošenja vakuum ne bi smio prelaziti 10 inHg, kako bi vezivanje IgG-a i proteina G bilo što učinkovitije. Za ispiranje cjelokupne plazme na pločicu se nakon toga nanose tri puta po 2 ml 1xPBS-a i svaki put se pločica isprazni uz pomoć vakuum manifold uređaja.

3.2.3.4 Elucija IgG-a

Na čistu pločicu za sakupljanje uzoraka od 2 ml postavlja se protein G pločica te se IgG eluira pomoću 1 ml 0.1 formijatne kiseline. Kako su neki glikani osjetljivi na kiseli medij dodaje se 170 μ L amonij bikarbonata koji se resuspendira, a služi za neutralizaciju. Eluat koji sadrži IgG vakuumom se skuplja u pločicu za sakupljanje uzoraka. Opet je bitno da za vrijeme sakupljanja IgG-a vakuum ne prelazi 10 inHg. Eluat se pohranjuje na -20°C do daljnje obrade.

3.2.3.5 Regeneracija i čuvanje protein G pločice

Pločica se prvo ispire s 2 ml 0.1M formijatne kiseline, nakon toga s 2 ml 10xPBS-a i na kraju s 4 ml 1xPBS-a. Nakon svakog koraka pločica se prazni pomoću vakuuma koji ne smije prelaziti 17 inHg. Nakon ispiranja dodaje se 1 ml pufera za čuvanje (20% EtOH u 20 mM TRIS-u i 0.1M NaCl) koji se isprazni uz pomoć vakuuma. Ponovo se doda 1 ml istog pufera, ali se on ovaj put ostavlja u jažicama pločice i ona se pohranjuje na +4°C. Natrij klorid se dodaje radi ujednačavanja osmolarnosti, tris je detergent, a etanol se koristi za dezinfekciju.

3.2.3.6 Deglikozilacija proteina

Uzorcima krvne plazme kao i uzorcima izoliranog IgG-a se dodaje 30 μ L 1.33% SDS-a koristeći nastavke za automatsku pipetu od 250 μ L te pipetom promiješa svaki uzorak. SDS uzrokuje denaturaciju proteina i tako „odmotani“ proteini otkrivaju svoje glikanske strukture koje je lakše pokidati enzimom. Pločicu se prekrije i zapečati adhezivnim filmom te inkubira 10 minuta na temperaturi 65°C. Po isteku 10 minuta, pločica se hladi na sobnoj temperaturi pola sata. Uzorcima ohlađenim na sobnu temperaturu dodaje se po 10 μ L 4% Igepala i promiješa pipetom. Igepal neutralizira višak dodanog SDS-a koji bi inače denaturirao i enzim kojeg dodajemo u idućem koraku. 10kDa filter pločicu stavljamo 15 minuta na tresilicu i po isteku vremena je stavljamo na pločicu za sakupljanje od 1mL.

3.2.3.7 Deglikozilacija

U ovom koraku koristi se otopina enzima PNG-aze F u 5xPBS-u. Svakom uzorku treba dodati 10 μ L 5xPBS-a i 0.12 μ L enzima PNG-aza F pa se pripremi ukupna količina za sve uzorke s tim da je prije pipetiranja PNG-aze F potrebno zavrtiti enzim na centrifugi kako bi se sadržaj spustio na dno i izbjegli gubici i nepreciznost pri pipetiranju. PNG-aza F je enzim koji kida vezu između N-glikana i proteina i oslobađa glikane za analizu, a 5xPBS je pufer koji osigurava uvjete potrebne za aktivnost enzima poput pH i osmolarnosti. 10 μ L otopine enzima dodaje se u svaku jažicu sa uzorcima te se pritom resuspendira sadržaj pipetom. Potom se pločica prekrije adhezivnom folijom te osigura njeno dobro prijanjanje kako uzorci ne bi isparili tijekom 18-satne inkubacije na 37 °C tijekom kojih enzim u inkubatoru kidanjem veza oslobodi N-glikane.

3.2.4 OBILJEŽAVANJE GLIKANA

3.2.4.1 Sakupljanje glikana

Pločicu za sakupljanje od 1ml na kojoj je 10 kDa filter pločica izvadi se iz inkubatora i centrifugira 20 minuta na 3500 okretaja u minuti bez skidanja adhezivnog filma. Potom se otpipetira 50 μ L ultra pročišćene vode u svaki uzorak i pločica stavi 5 minuta na tresilicu. Postupak centrifugiranja ponavlja se sa dodatnih 20 minuta na 3500 okretaja u minuti.

3.2.4.2 Priprema 2-AB otopine za obilježavanje glikana

Priprema 2-AB otopine za obilježavanje glikana opisana je u tablici reagenasa. 2-aminobenzamid je reagens za derivatizaciju glikana te omogućuje detekciju derivata glikana na UPLC fluorescencijskom detektoru. 2-pikolin boran je reducens te osigurava kvantitativnost reakcije derivatizacije glikana. Octena kiselina osigurava potrebnu kiselost medija dok dimetilsulfoksid kao kootapalo omogućava otapanje 2-aminobenzamida i 2-pikolin borana budući da su obje kemikalije slabo topljive u vodi.

3.2.4.3 Obilježavanje N-glikana derivatizacijom

U svaku jažicu s uzorcima dodaje se 25 μL otopine za obilježavanje i sadržaj promiješa resuspendiranjem pipetom. Zatim se sve jažice na pločici prekriju adhezivnim filmom i pločica se stavlja 10 minuta na tresilicu kako bi se sadržaj promiješao. Potom slijedi inkubacija na 65° C tijekom 2 sata u inkubatoru i hlađenje uzoraka na sobnoj temperaturi pola sata.

3.2.4.4 Priprema GHP pločice

GHP pločicu potrebno je pripremiti za korištenje kako bi se glikani zadržali na hidrofilnoj membrani. Kroz jažice na pločici propušta se redom 200 μL 70% etanola, zatim 200 μL ultra pročišćene vode i na kraju 200 μL acetonitrila. Propuštanje otopina ubrzava se pomoću vakuum uređaja pazeći pritom da vakuum ne prekorači graničnu vrijednost od 2 inHg.

3.2.4.5 Pročišćavanje 2-AB obilježenih N-glikana

Svakom uzorku glikana derivatiziranih 2-AB reagensom doda se 700 μL acetonitrila, sadržaj svake jažice promiješa se pipetom i ukupni sadržaj svake jažice pipetom se prenese na GHP pločicu. Nakon dvominutne inkubacije sadržaj pločica se isisa pomoću vakuuma. Glikani koji su po svojim karakteristikama hidrofilne naravi će se zadržati na hidrofilnim membranama GHP pločice. Sljedeći korak je ispiranje GHP pločice 4 puta sa po 200 μL acetonitrila kojeg se isisa vakuumskom sisaljkom pazeći pritom da vakuum ne prekorači 2 inHg i time se osigurava vezanje i zadržavanje glikana na GHP pločici. Zatim se GHP pločicu sa uzorcima

stavlja na pločicu za sakupljanje zapremnine 1 ml te se otpipetiram po 200 μ L acetonitrila u svaku jažicu i potom se pločica centrifugira tijekom 5 minuta na 1000 okretaja u minuti.

3.2.4.6 Eluiranje obilježenih N-glikana

Nakon centrifugiranja GHP pločicu s uzorcima stavlja se na novu čistu pločicu za sakupljanje uzoraka od 1 ml u kojoj će ovim korakom biti sakupljeni uzorci glikana. U svaku jažicu dodaje se 100 μ L ultra pročišćene vode i 15 minuta miješa uzorke postavljanjem pločice na tresilicu. Primjenom vakuuma se sakuplja prva frakcija uzoraka eluata u pločicu za sakupljanje. Drugu frakciju sakuplja se dodavanjem još 100 μ L u svaku jažicu i postavljenjem pločice ponovo na tresilicu tijekom 15 minuta i centrifugiranjem GHP pločice sa pločicom za sakupljanje uzoraka tijekom 5 minuta na 1000 okretaja u minuti. Nakon provjere da nema zaostalih kapljica u GHP pločici tijekom centrifugiranja, uzorke iz pločice za sakupljanje volumena od 200 μ L prenosi se na PCR pločicu zapremnine 300 μ L, poklopcima se zatvara jažice te se PCR pločica sa uzorcima pohranjuje na -20°C do analize.

3.2.4.7 Analiza derivata glikana HILIC-UPLC metodom (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Ultra Performance Liquid Chromatography)

Prethodno derivatizirani, odnosno fluorescentno obilježeni N-glikani, razdvojeni su kromatografijom hidrofilnih interakcija na Waters Acquity UPLC instrumentu. Waters Acquity UPLC sastoji se od sljedećih glavnih dijelova: pumpe za mobilnu fazu, kolone, automatskog injektora uzoraka i fluorescentnog detektora koji je namješten na valnu duljinu od 330 nm za ekscitaciju i valnu duljinu od 420 nm za emisiju. Derivatizirani N-glikani razdvojeni su na Acquity UPLC BEH Glycan koloni za kromatografiju glikana, dimenzija kolone 100 mm x 2.1 mm, koja je napunjena česticama veličine 1.7 μ m. Kao otapalo A korišten je 100 mM amonij formijat podešen na pH 4.40, a acetonitril je korišten kao otapalo B. Uvjeti analize glikana IgG-a bili su sljedeći: linearni gradijent acetonitrila od 75-62 % s brzinom protoka 0.4 ml/min, tijekom 25 min, a temperatura na kojoj se analiza odvijala bila je 60°C .

| Vrijeme (min) | Protok (mL/min) | %A | %B |
|---------------|-----------------|--------|-------|
| početno | 0.400 | 25.00 | 75.00 |
| 25 | 0.400 | 38.00 | 62.00 |
| 26 | 0.400 | 100.00 | 0.00 |
| 28 | 0.400 | 100.00 | 0.00 |
| 29 | 0.400 | 25.00 | 75.00 |
| 34 | 0.400 | 25.00 | 75.00 |

Tablica 1: Promjena postotaka otapala A i B tijekom kromatografske analize N-glikana IgG-a

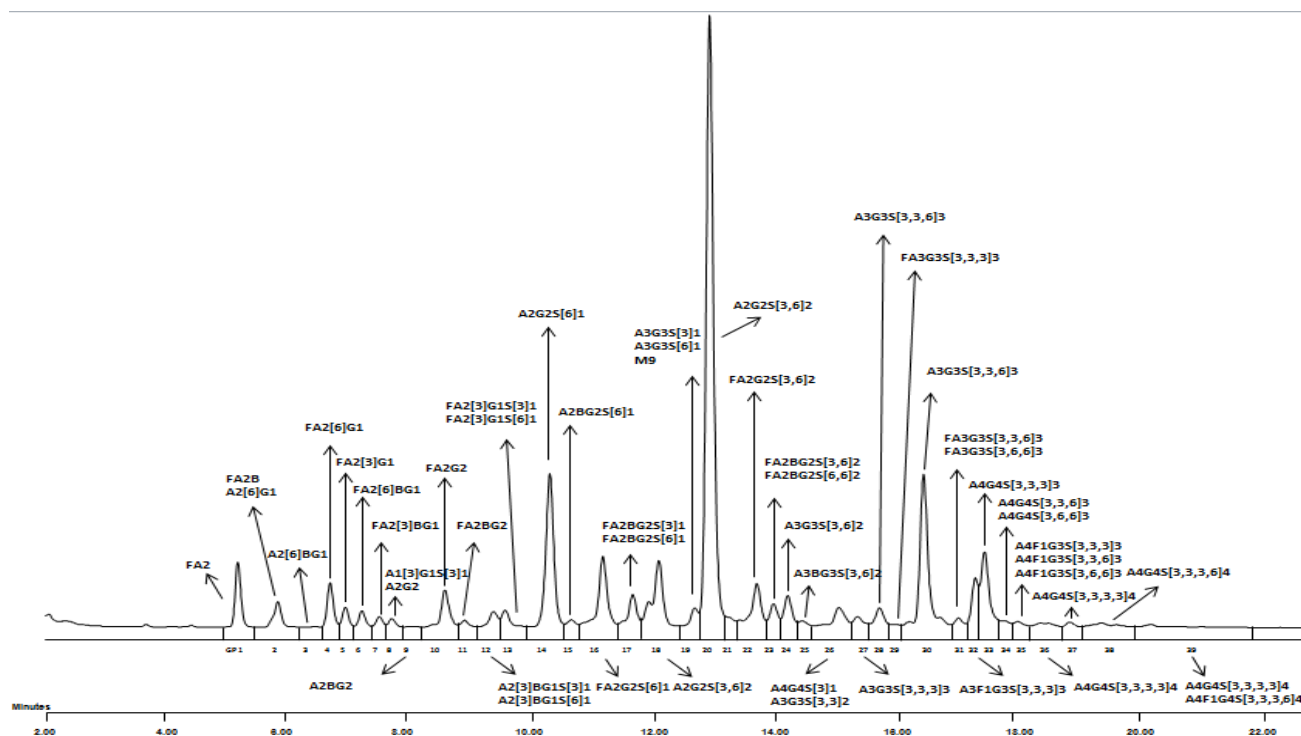
Uvjeti analize N-glikana plazmatskih proteina su bili sljedeći: linearni gradijent acetonitrila od 70-53 % s brzinom protoka 0.561 ml/min, tijekom 24.81 min, a temperatura na kojoj se analiza odvijala bila je 25°C.

| Vrijeme (min) | Protok (mL/min) | %A | %B |
|---------------|-----------------|--------|-------|
| početno | 0.561 | 30.00 | 70.00 |
| 25 | 0.561 | 30.00 | 70.00 |
| 26 | 0.561 | 47.00 | 53.00 |
| 28 | 0.250 | 100.00 | 0.00 |
| 29 | 0.250 | 100.00 | 0.00 |
| 34 | 0.250 | 25.00 | 70.00 |

Tablica 2: Promjena postotaka otapala A i B tijekom kromatografske analize N-glikana ukupnih proteina plazme

4. REZULTATI I RASPRAVA

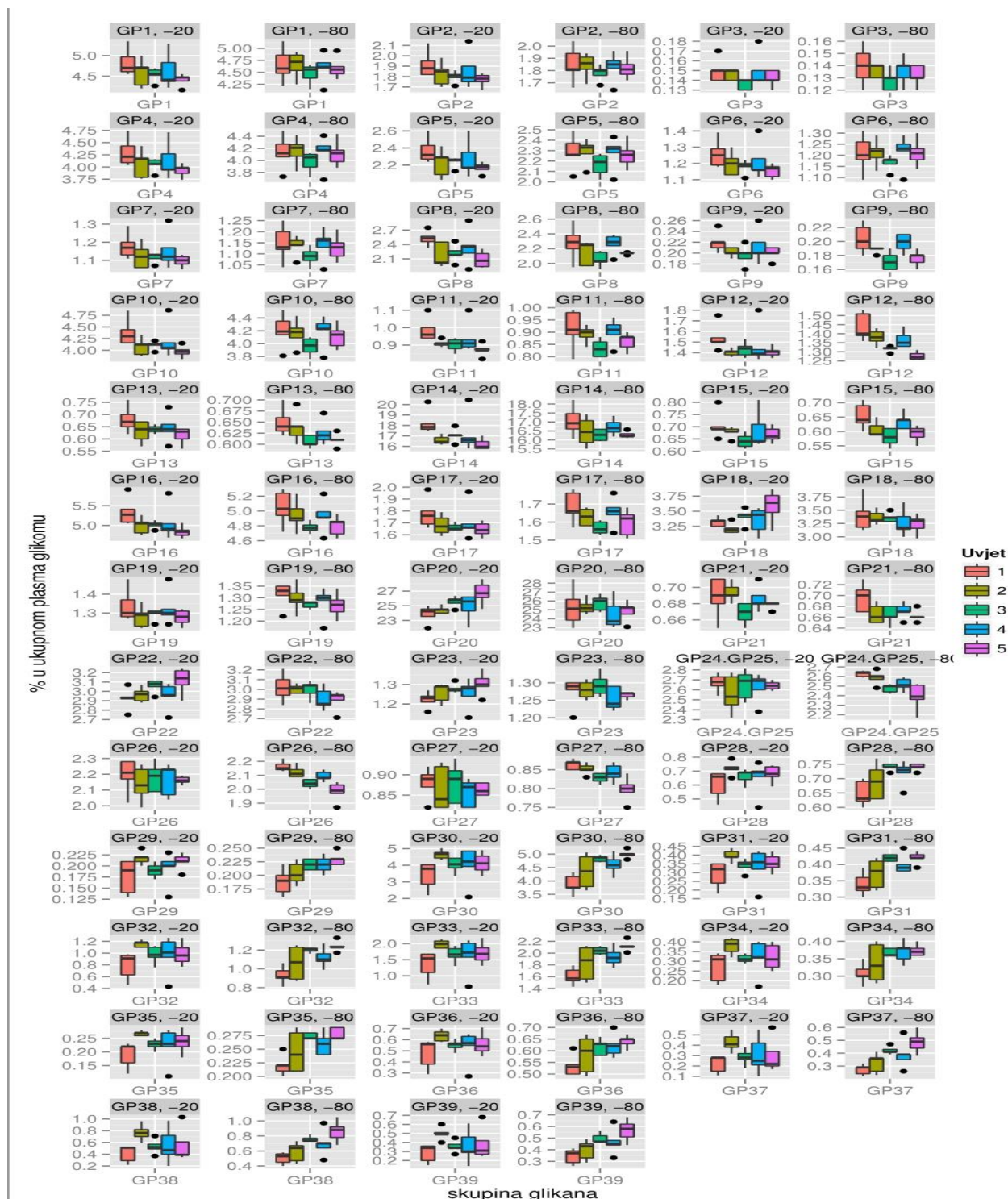
Kako bi se odredio utjecaj broja zamrzavanja i načina odmrzavanja na glikozilaciju proteina plazme, uzorci plazme su izloženi djelovanju pet različitih uvjeta zamrzavanja i odmrzavanja. Plazmatski proteini, kao i iz plazme izolirani IgG, su deglikozilirani pomoću PNG-aze F nakon eksperimentom utvrđenog načina odmrzavanja, a otpušteni glikani obilježeni su 2-aminobenzoamidom te analizirani tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti koja se bazira na hidrofilnim interakcijama (UPLC-HILIC). Dobiveni kromatogrami integrirani su na način da su podijeljeni u 39 skupina u slučaju ukupnih glikana plazme te 24 skupine u slučaju glikanskih struktura izoliranog IgG-a. Ove skupine sadržavaju određene glikanske strukture kako je prikazano na Slici 3 za glikane plazme te Slici 6 za glikane IgG-a. Dobiveni kromatogrami predstavljaju glikane koji izlaze prema kriteriju polarnosti i veličine. Prema tim kriterijima, očekivano prvo izlaze manje i hidrofobnije molekule, dok veće i polarnije molekule, posebno one nabijene s više sijalinskih kiselina, izlaze posljednje najduže se zadržavajući na koloni.



Slika 3. UPLC kromatogram bitnih N-glikanskih struktura krvne plazme

Kratice struktura: svi N-glikani imaju dva GlcNAc-a u sklopu svoje jezgre; F na početku kratice upućuje na fukoze u jezgri vezane α 1-6 vezom na unutarnji GlcNAc; Mx, broj (x) manoze na GlcNAc-u u jezgri; D1 označava da je α 1-2 manaza vezana na Man α 1-6Man α 1-6 grani, D2 na Man α 1-3Man α 1-6 grani, D3 na Man α 1-3 grani od M6 i na Man α 1-2Man α 1-3 grani od M7 i M8; Ax, broj grana (GlcNAc) na tromanoznoj jezgri; A2, biantenarna s oba GlcNAc-a vezana β 1-2 vezom; A3, triantenarna s GlcNAc vezanim β 1-2 vezom na manozu i na treći GlcNAc vezan β 1-4 vezom na manozu vezanu α 1-3 vezom; A4, GlcNAc-i vezani kao A3 s dodatnim GlcNAc-om vezanim β 1-6 vezom na manozu vezanu α 1-6 vezom; B, presijeca β 1-4 vezan GlcNAc na β 1-3 manozu; Gx, broj (x) β 1-4 vezanih galaktoza na grani; [3]G1 i [6]G1 označava da je galaktoza na grani α 1-3 ili α 1-6 manoze; Fx, broj (x) α 1-3 vezane fukoze na granu GlcNAc-a; Lac(x), broj (x) produžetaka laktozamina (Gal β 1-4GlcNAc); Sx, broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu; brojevi 3, 6, ili ? iza S u zagradi označavaju je li sijalinska kiselina vezana α 2-3, α 2-6 ili nepoznatim vezom.

Nakon određivanja udjela pojedine glikanske skupine u svakom kromatogramu, uspoređene su dobivene vrijednosti za pet uvjeta odmrzavanja i zamrzavanja na -20°C te na -80°C . Usporedbe su dane na Slici 4.



Slika 4: Vrijednosti udjela pojedine glikanske skupine u glikomu plazme za svaki od pet ispitanih uvjeta odmrzavanja i zamrzavanja. Slika je box-plot prikaz (crta u sredini prikazuje medijan, pravokutnik vrijednosti od 25-te do 75-te percentile, a okomite linije obuhvaćaju sve vrijednosti. Točkama su prikazane vrijednosti koje odudaraju od ostatka skupine).

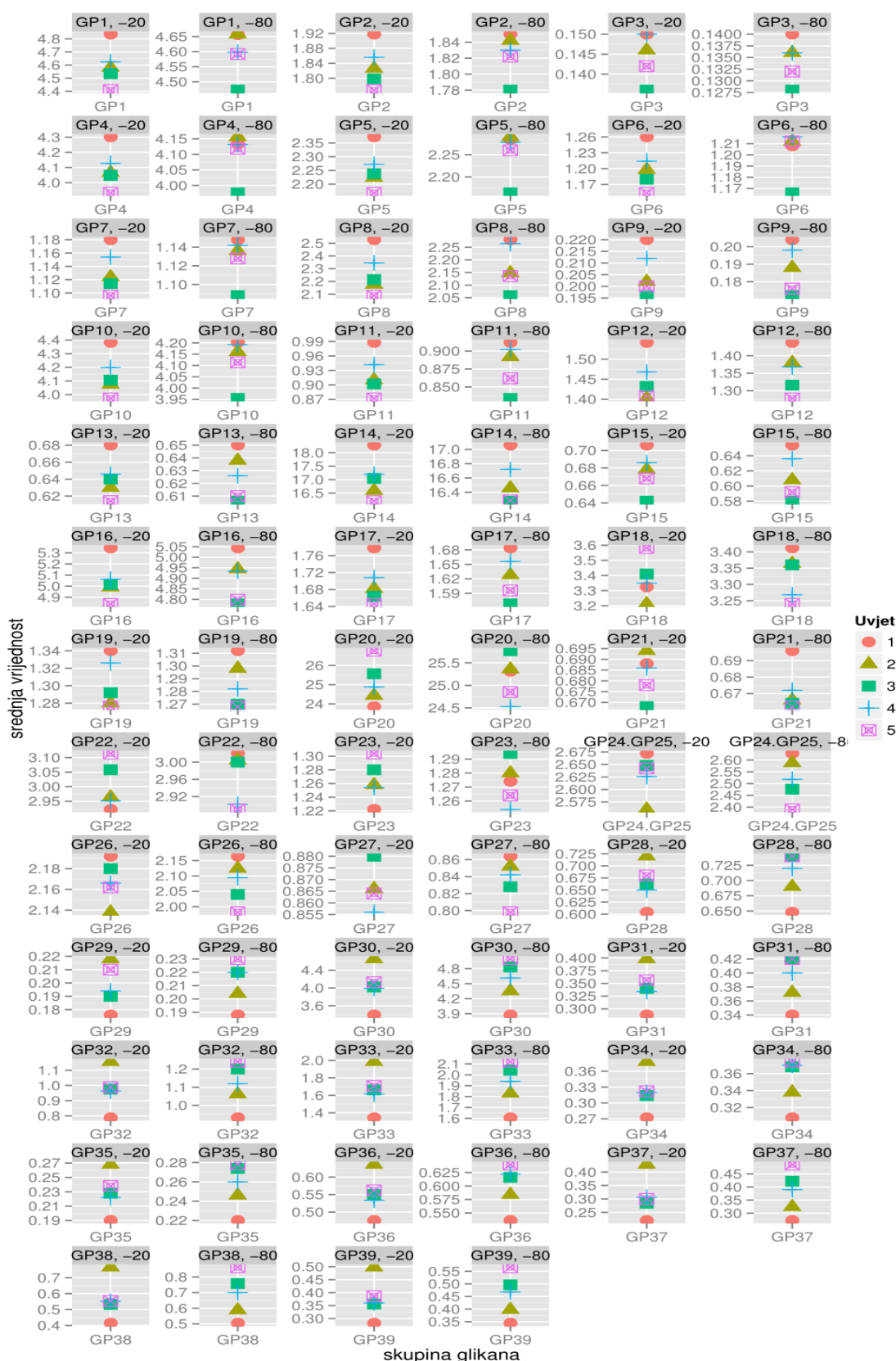
Uvjet 1: odmrzavanje tri puta na sobnoj temperaturi
Uvjet 2: odmrzavanje dva puta na sobnoj temperaturi
Uvjet 3: odmrzavanje jednom na sobnoj temperaturi

Uvjet 4: odmrzavanje preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$
Uvjet 5: odmrzavanje preko noći na sobnoj temperaturi

Iz Slike 5 vidljivo je da različit broj te uvjeti zamrzavanja i odmrzavanja utječu na rezultat analize glikozilacije plazmatskih proteina. Sve glikanske skupine nisu jednako podložne tim utjecajima, ali se iz slike može vidjeti da Uvjet 1, kod kojeg su uzorci zamrzavani tri puta, ima najveće raspršenje unutar rezultata te da najviše odudara od ostalih uvjeta.

Radi lakše usporedbe, na Slici 5 uspoređene su srednje vrijednosti pentaplikata za svaki pojedini predanalitički uvjet.

Slika potvrđuje očekivani rezultat pa vidimo da vrijednosti Uvjeta 1 najviše odudaraju od rezultata ostalih uvjeta za većinu glikanskih skupina. To je vrlo jasno vidljivo kod primjerice GP1, GP7, GP10, GP21, GP36. Osim Uvjeta 1, za pojedine glikanske strukture ukupnih proteina plazme nešto veće odskakanje prikazuje i Uvjet 5 koji uključuje odmrzavanje na sobnoj temperaturi preko noći. Dakle, najveća odstupanja postoje za uvjet u kojem su uzorci zamrzavani tri puta, ali i također za uzorke koji su odmrzavani preko noći na sobnoj temperaturi što su eksperimentom najnepovoljniji predviđeni uvjeti baratanja uzorcima. To odstupanje je najoučljivije kod GP11, GP18, GP22.



Slika 5: Srednja vrijednost relativnih površina ispod kromatografskih vršaka za svaku skupinu N-glikana plazme za svaki uvjet.

Uvjet 1: odmrzavanje tri puta na sobnoj temperaturi
 Uvjet 2: odmrzavanje dva puta na sobnoj temperaturi
 Uvjet 3: odmrzavanje jednom na sobnoj temperaturi

Uvjet 4: odmrzavanje preko noći na +4° C
 Uvjet 5: odmrzavanje preko noći na sobnoj temperaturi

Izračunati su i koeficijenti varijacija pojedinih mjerenja te prikazani u Tablici 3

| | Uvjet 1 | Uvjet 2 | Uvjet 3 | Uvjet 4 | Uvjet 5 | Uvjet 1* | Uvjet 2* | Uvjet 3* | Uvjet 4* | Uvjet 5* | CV |
|-------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GP1 | 6.8 | 7.3 | 3.7 | 9.4 | 3.4 | 7.8 | 5.8 | 4.7 | 6.5 | 4.9 | 2.5 |
| GP2 | 6.5 | 6.2 | 3.1 | 9.4 | 3.5 | 7.9 | 5.3 | 3.6 | 6.5 | 5.0 | 2.3 |
| GP3 | 8.2 | 3.8 | 4.0 | 11.5 | 5.9 | 11.3 | 4.0 | 6.5 | 8.4 | 6.3 | 5.3 |
| GP4 | 6.7 | 7.0 | 3.3 | 9.0 | 3.3 | 6.8 | 5.4 | 4.3 | 6.6 | 5.2 | 2.5 |
| GP5 | 6.2 | 7.2 | 2.7 | 9.2 | 2.9 | 7.1 | 5.3 | 4.9 | 6.8 | 5.5 | 2.7 |
| GP6 | 6.8 | 6.0 | 3.5 | 9.2 | 3.7 | 6.9 | 4.8 | 2.9 | 6.2 | 4.9 | 2.5 |
| GP7 | 6.0 | 6.1 | 2.3 | 8.7 | 2.9 | 7.0 | 4.0 | 3.8 | 6.2 | 5.1 | 2.4 |
| GP8 | 6.1 | 11.8 | 8.2 | 15.7 | 8.1 | 10.2 | 7.6 | 5.0 | 5.8 | 0.7 | 6.3 |
| GP9 | 8.5 | 4.1 | 9.3 | 14.3 | 6.1 | 10.2 | 2.4 | 7.6 | 6.6 | 6.5 | 7.5 |
| GP10 | 6.5 | 4.5 | 2.2 | 9.1 | 3.1 | 6.3 | 5.0 | 3.6 | 5.8 | 4.5 | 3.0 |
| GP11 | 6.8 | 2.1 | 4.1 | 9.6 | 4.1 | 8.9 | 3.8 | 4.3 | 5.8 | 4.2 | 4.7 |
| GP12 | 8.1 | 2.4 | 4.9 | 12.8 | 3.5 | 5.3 | 3.1 | 1.2 | 3.4 | 1.7 | 5.3 |
| GP13 | 7.9 | 7.0 | 2.5 | 8.9 | 5.6 | 4.9 | 5.2 | 2.2 | 4.3 | 2.3 | 3.5 |
| GP14 | 6.2 | 2.6 | 3.7 | 10.8 | 3.3 | 4.9 | 4.8 | 2.0 | 2.7 | 1.1 | 3.7 |
| GP15 | 7.9 | 3.4 | 4.5 | 11.1 | 4.8 | 6.9 | 4.4 | 5.3 | 4.5 | 4.7 | 6.5 |
| GP16 | 6.5 | 4.2 | 1.9 | 8.6 | 3.0 | 4.6 | 4.1 | 1.5 | 4.4 | 2.8 | 3.3 |
| GP17 | 7.1 | 4.9 | 1.8 | 8.7 | 3.7 | 5.1 | 2.9 | 2.3 | 4.8 | 4.6 | 3.5 |
| GP18 | 2.3 | 2.8 | 3.9 | 6.4 | 7.5 | 8.9 | 3.8 | 2.6 | 7.7 | 5.6 | 3.1 |
| GP19 | 6.5 | 4.5 | 2.3 | 6.9 | 3.3 | 4.1 | 4.5 | 1.1 | 5.1 | 4.2 | 1.9 |
| GP20 | 4.9 | 2.1 | 2.9 | 7.1 | 5.8 | 8.5 | 3.3 | 3.4 | 7.0 | 4.6 | 3.2 |
| GP21 | 3.6 | 1.6 | 2.0 | 2.2 | 0.7 | 3.7 | 2.7 | 2.5 | 2.2 | 1.7 | 1.9 |
| GP22 | 3.9 | 2.6 | 2.3 | 4.8 | 4.4 | 4.7 | 1.5 | 3.0 | 3.9 | 3.6 | 2.4 |
| GP23 | 3.3 | 4.0 | 1.8 | 6.1 | 4.5 | 3.3 | 2.0 | 2.5 | 2.7 | 0.7 | 1.8 |
| GP(24+25) | 3.3 | 7.4 | 5.6 | 5.6 | 1.7 | 1.2 | 2.8 | 1.8 | 2.5 | 5.9 | 3.5 |
| GP26 | 4.9 | 5.2 | 4.2 | 4.7 | 1.1 | 1.7 | 2.0 | 1.5 | 1.7 | 3.5 | 3.2 |
| GP27 | 4.3 | 6.3 | 5.6 | 3.9 | 1.8 | 1.6 | 1.7 | 1.6 | 2.8 | 4.1 | 2.9 |
| GP28 | 16.5 | 6.9 | 8.0 | 18.9 | 8.9 | 6.8 | 8.9 | 1.7 | 5.8 | 1.7 | 6.6 |
| GP29 | 21.9 | 6.8 | 8.3 | 19.5 | 8.9 | 12.7 | 10.2 | 4.5 | 7.2 | 5.3 | 8.5 |
| GP30 | 24.3 | 6.0 | 11.3 | 28.5 | 15.1 | 9.5 | 14.6 | 2.4 | 8.1 | 3.0 | 11.5 |
| GP31 | 26.1 | 8.6 | 11.2 | 31.5 | 14.3 | 10.4 | 12.2 | 2.4 | 7.3 | 4.5 | 11.7 |
| GP32 | 29.3 | 5.1 | 14.9 | 33.9 | 19.5 | 10.0 | 17.0 | 2.1 | 9.3 | 4.6 | 13.3 |
| GP33 | 31.0 | 6.2 | 14.8 | 35.5 | 19.8 | 9.0 | 15.8 | 3.1 | 8.5 | 4.2 | 13.5 |
| GP34 | 27.9 | 11.1 | 6.6 | 28.7 | 20.5 | 9.6 | 16.4 | 3.0 | 8.3 | 4.5 | 10.5 |
| GP35 | 25.2 | 3.1 | 8.4 | 30.5 | 17.4 | 8.5 | 15.4 | 2.0 | 8.2 | 3.9 | 11.6 |
| GP36 | 27.9 | 8.1 | 8.8 | 28.7 | 18.0 | 8.4 | 13.9 | 5.7 | 8.0 | 4.1 | 9.3 |
| GP37 | 37.9 | 20.9 | 26.1 | 58.3 | 54.7 | 15.0 | 23.4 | 7.2 | 27.9 | 17.1 | 24.4 |
| GP38 | 35.6 | 18.0 | 23.3 | 54.1 | 51.5 | 15.1 | 22.3 | 5.1 | 25.3 | 16.3 | 22.6 |
| GP39 | 35.3 | 14.3 | 18.5 | 50.0 | 45.9 | 19.0 | 21.2 | 8.6 | 23.9 | 16.6 | 21.1 |
| SREDNJA VRIJEDNOST | 13.0 | 6.4 | 6.7 | 16.9 | 10.4 | 7.7 | 7.7 | 3.5 | 7.3 | 5.0 | 6.7 |

Tablica 3: Koeficijenti varijacije za pentaplikate svakog od ispitivanih uvjeta izračunati za pojedine glikanske skupine. Uvjeti 1-5 zamrzavani su na -20 °C, a Uvjeti 1*-5* zamrzavani su na -80°C.

Uvjet 1: odmrzavanje tri puta na sobnoj temperaturi
 Uvjet 2: odmrzavanje dva puta na sobnoj temperaturi
 Uvjet 3: odmrzavanje jednom na sobnoj temperaturi

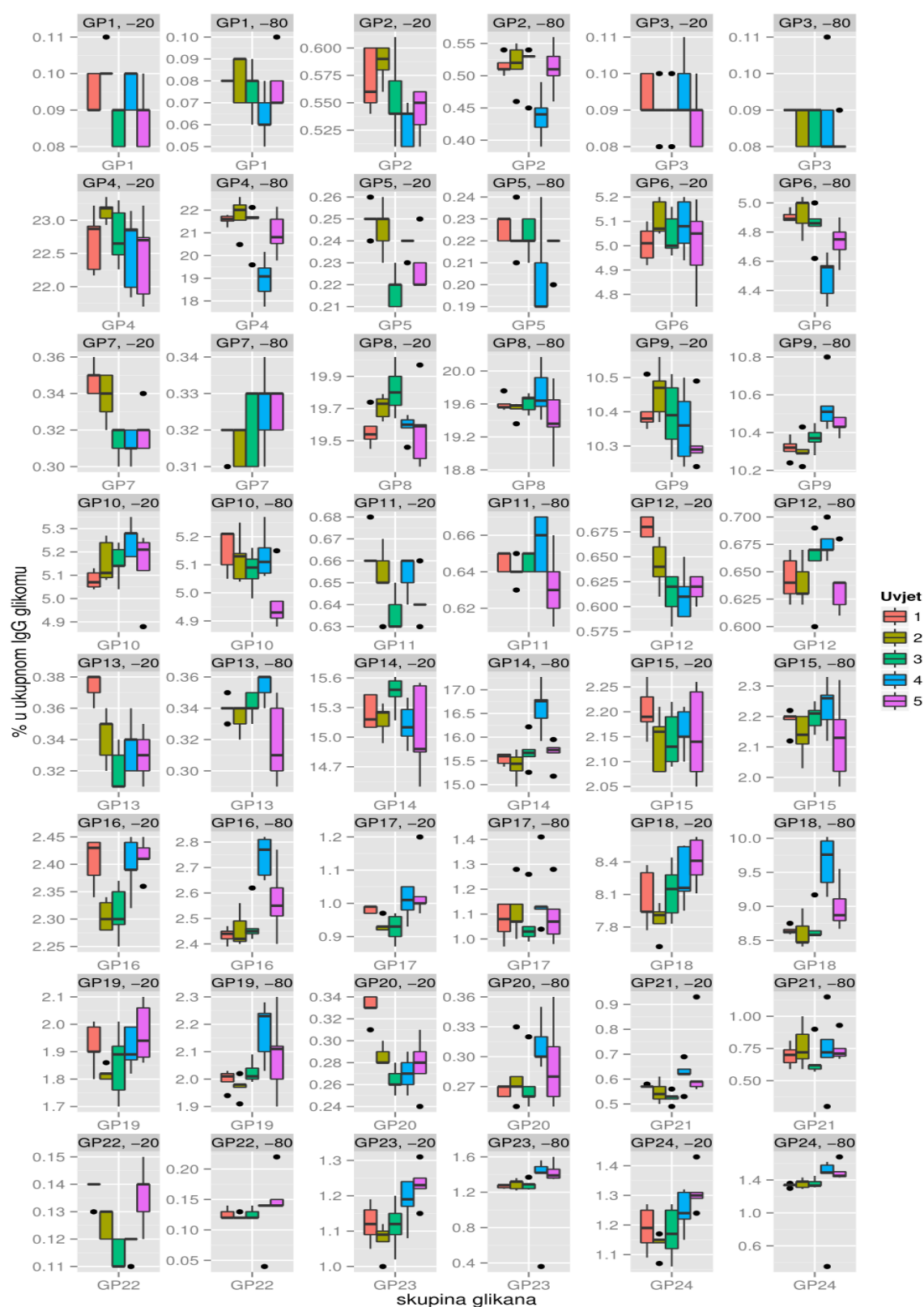
Uvjet 4: odmrzavanje preko noći na +4° C
 Uvjet 5: odmrzavanje preko noći na sobnoj temperaturi

Za svaku glikansku strukturu izražena je vrijednost koeficijenta varijacije između svih testiranih uvjeta iz čega je vidljivo da su složeniji i sijalizirani glikani osjetljiviji na broj i uvjete zamrzavanja i odmrzavanja uzorka plazme.

Nakon što je iz svake, različito tretirane plazme, izoliran imunoglobulin G, također je analizirana i njegova glikozilacija.

Dobiveni kromatogrami analize glikanskih struktura IgG-a predstavljaju N-glikane koji izlaze po veličini i polarnosti kao i u slučaju analize N-glikana ukupnih proteina plazme. Prema tim kriterijima, prvo izlaze manje i hidrofobnije molekule koje se slabije zadržavaju na hidrofilnoj koloni, dok veće molekule i one polarnije posebno one nabijene izlaze na kraju. Vrijeme u kojemu se N-glikani IgG-a uglavnom pojavljuju je od 7. do 24. minute.

Na daljnjim slikama uspoređene su vrijednosti mjerenja za pojedinu glikansku skupinu, ovisno o predanalitičkom tretmanu, na isti način na koji su prikazani i za analizu N-glikana plazme. Dakle, Slika 7 prikazuje usporedbu mjerenja u Box and Whisker prikazu, Slika 8 usporedbu srednjih vrijednosti, a Tablica 4 utjecaj tretmana na pojedine glikanske strukture izražen koeficijentom varijacije.



Slika 7: Vrijednosti udjela pojedine glikanske skupine u glikomu IgG-a za svaki od pet ispitanih uvjeta odmrzavanja i zamrzavanja. Slika je box-plot prikaz (crta u sredini prikazuje medijan, pravokutnik vrijednosti od 25-te do 75-te percentile, a okomite linije obuhvaćaju sve vrijednosti. Točkama su prikazane vrijednosti koje odudaraju od ostatka skupine).

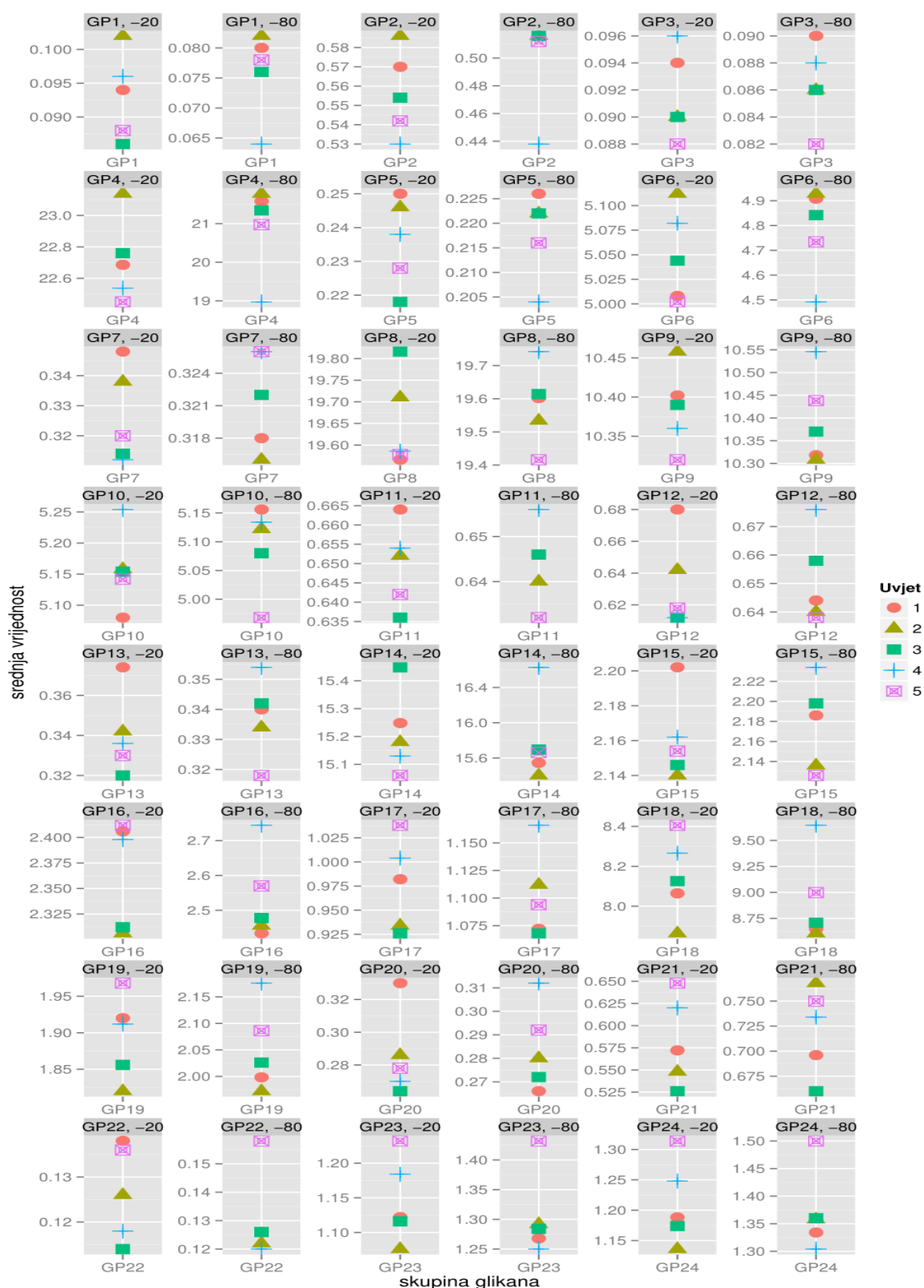
Uvjet 1: odmrzavanje tri puta na sobnoj temperaturi

Uvjet 2: odmrzavanje dva puta na sobnoj temperaturi

Uvjet 3: odmrzavanje jednom na sobnoj temperaturi

Uvjet 4: odmrzavanje preko noći na +4° C

Uvjet 5: odmrzavanje preko noći na sobnoj temperaturi



Slika 8: Srednja vrijednost relativnih površina ispod kromatografskih vršaka za svaku skupinu N-glikana IgG-a za svaki uvjet
 Uvjet 1: odmrzavanje tri puta na sobnoj temperaturi
 Uvjet 2: odmrzavanje dva puta na sobnoj temperaturi
 Uvjet 3: odmrzavanje jednom na sobnoj temperaturi
 Uvjet 4: odmrzavanje preko noći na +4° C
 Uvjet 5: odmrzavanje preko noći na sobnoj temperaturi

| | Uvjet 1 | Uvjet 2 | Uvjet 3 | Uvjet 4 | Uvjet 5 | Uvjet 1* | Uvjet 2* | Uvjet 3* | Uvjet 4* | Uvjet 5* | CV |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GP1 | 5.8 | 4.4 | 6.4 | 5.7 | 9.5 | 0.0 | 13.4 | 15.0 | 17.8 | 16.7 | 13.1 |
| GP2 | 5.0 | 2.9 | 6.8 | 3.5 | 4.0 | 2.9 | 6.8 | 7.2 | 8.5 | 7.2 | 7.7 |
| GP3 | 5.8 | 7.9 | 7.9 | 9.3 | 9.5 | 0.0 | 6.4 | 6.4 | 14.8 | 5.5 | 4.5 |
| GP4 | 2.0 | 0.7 | 1.9 | 2.6 | 2.8 | 1.0 | 3.7 | 4.7 | 4.9 | 4.4 | 5.6 |
| GP5 | 2.8 | 4.6 | 3.8 | 1.9 | 5.7 | 2.4 | 4.9 | 3.8 | 10.7 | 4.1 | 6.2 |
| GP6 | 1.5 | 1.4 | 1.7 | 2.2 | 3.4 | 0.8 | 2.5 | 2.9 | 3.4 | 2.8 | 3.8 |
| GP7 | 2.4 | 3.9 | 2.8 | 2.7 | 3.8 | 1.4 | 1.7 | 3.4 | 3.5 | 1.7 | 3.5 |
| GP8 | 0.6 | 0.4 | 0.8 | 0.4 | 1.3 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 1.5 | 2.1 | 0.6 |
| GP9 | 0.6 | 0.7 | 1.0 | 1.0 | 0.9 | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 1.4 | 0.4 | 0.7 |
| GP10 | 0.8 | 1.7 | 1.5 | 1.4 | 3.0 | 1.5 | 1.7 | 1.4 | 1.7 | 2.2 | 1.4 |
| GP11 | 1.3 | 2.3 | 1.4 | 1.4 | 1.7 | 0.8 | 1.1 | 0.8 | 2.3 | 3.0 | 1.5 |
| GP12 | 1.5 | 3.7 | 3.5 | 4.1 | 2.1 | 3.2 | 3.1 | 5.2 | 2.2 | 4.2 | 3.8 |
| GP13 | 2.4 | 4.8 | 4.4 | 5.0 | 4.8 | 2.1 | 2.7 | 2.4 | 2.5 | 8.1 | 4.8 |
| GP14 | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.4 | 3.0 | 0.8 | 1.9 | 2.2 | 3.0 | 1.8 | 2.9 |
| GP15 | 2.3 | 2.7 | 2.6 | 2.1 | 4.4 | 1.8 | 3.3 | 2.0 | 3.6 | 6.5 | 1.6 |
| GP16 | 1.8 | 1.2 | 2.1 | 2.2 | 1.4 | 1.3 | 2.8 | 3.3 | 2.9 | 5.3 | 5.2 |
| GP17 | 1.1 | 2.2 | 4.5 | 5.1 | 8.9 | 6.8 | 9.5 | 10.3 | 12.1 | 10.7 | 7.5 |
| GP18 | 3.2 | 1.9 | 3.1 | 3.2 | 2.6 | 0.7 | 2.7 | 3.0 | 4.0 | 3.9 | 6.1 |
| GP19 | 4.4 | 1.3 | 6.7 | 4.0 | 5.5 | 1.8 | 2.0 | 2.0 | 4.9 | 7.2 | 5.4 |
| GP20 | 3.7 | 3.1 | 4.3 | 5.9 | 9.3 | 2.1 | 10.7 | 10.2 | 7.7 | 15.2 | 7.5 |
| GP21 | 0.8 | 7.9 | 4.8 | 9.3 | 24.4 | 12.3 | 21.2 | 20.6 | 41.5 | 14.0 | 13.1 |
| GP22 | 3.2 | 4.3 | 4.8 | 3.8 | 8.4 | 7.1 | 3.7 | 7.1 | 37.3 | 22.1 | 10.0 |
| GP23 | 4.9 | 4.3 | 6.0 | 5.6 | 4.7 | 1.7 | 4.6 | 4.3 | 40.1 | 7.2 | 8.6 |
| GP24 | 6.3 | 3.4 | 7.5 | 5.6 | 5.3 | 1.6 | 4.2 | 4.2 | 41.1 | 6.9 | 8.4 |
| SREDNJA VRIJEDNOST | 2.7 | 3.0 | 3.8 | 3.7 | 5.4 | 2.3 | 4.8 | 5.1 | 11.4 | 6.8 | 5.6 |

Tablica 4: Koeficijenti varijacije za pentaplikate svakog od ispitivanih uvjeta izračunati za pojedine glikanske skupine. Uvjeti 1-5 su zamrzavani na -20 °C, a Uvjeti 1*-5* su zamrzavani na -80°C.

Uvjet 1: odmrzavanje tri puta na sobnoj temperaturi

Uvjet 2: odmrzavanje dva puta na sobnoj temperaturi

Uvjet 3: odmrzavanje jednom na sobnoj temperaturi

Uvjet 4: odmrzavanje na +4° C

Uvjet 5: odmrzavanje preko noći na sobnoj temperaturi

Iz navedenih prikaza je vidljivo da različit broj te uvjeti zamrzavanja utječu i na glikanske strukture otpuštene s imunoglobulina G, ali u manjoj mjeri. Ovaj rezultat je bio i očekivan s obzirom da je maksimalna složenost glikanske strukture IgG-a manja od maksimalno moguće složenih glikana prisutnih na proteinima plazme. Što su veće glikanske strukture IgG-a tim kasnije izlaze iz kolone te na temelju porasta vrijednosti relativne standardne devijacije za takve glikanske strukture zaključujem da su složenije molekule IgG-a, pogotovo one sa dvije molekule sijalinske kiseline, osjetljivije na broj zamrzavanja. Također je moguće vidjeti da drastičnost uvjeta također doprinosi dobivenim razlikama, ali je i ovaj fenomen puno manje izražen nego kod analize ukupnih proteina plazme.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj broja i načina zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka plazme na analizu glikanskih struktura ukupnih proteina plazme i, iz iste plazme izoliranog, IgG-a kao proteina od posebnog interesa. Uzorci plazme te iz odmrzavane plazme pomoću protein G pločice izoliran IgG podvrgnuti su različitim uvjetima zamrzavanja i odmrzavanja. N-glikani su otpušteni pomoću PNG-aze F i obilježeni 2-aminobenzamidom. Tako obilježeni glikani su kromatografski analizirani pomoću tekućinske kromatografije vrlo visoke djelotvornosti bazirane na hidrofilnim interakcijama (UPLC-HILIC), određene su površine ispod kromatografskih vršaka u svakom kromatogramu, a rezultati su obrađeni te su pokazali sljedeće:

1. Zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka plazme prije analize glikozilacije ukupnih proteina plazme ili izoliranog IgG nema znatan utjecaj na rezultate HILIC-UPLC kromatografije ukoliko su uzorci zamrzavani te kratko odmrzavani jedan ili dva puta na sobnoj temperaturi.
2. Odmrzavanje uzorka plazme preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$ ne utječe na rezultate analize glikozilacije proteina plazme.
3. Postoji utjecaj na rezultate analize glikozilacije ukupnih proteina plazme i IgG-a ako je uzorak odmrzavan tri puta te ukoliko je odmrzavan jednom, ali preko noći na sobnoj temperaturi.
4. Rezultati uzoraka pohranjivanih na -80°C pokazuju manju raspršenost i veću međusobnu podudarnost u usporedbi s uzorcima pohranjivanim na -20°C
5. Utjecaji navedeni pod točkom 3. nisu veliki, ali je iz grafičkih prikaza jasno da postoje u smislu najvećeg odudaranja ovih skupina od ostalih te najvećeg raspršenja rezultata unutar ove dvije skupine.
6. Statističku značajnost evidentnih odstupanja navedenih pod točkom 3. nije moguće kvantificirati iz samo 5 ponavljanja već bi bilo potrebno provesti puno veću studiju.
7. Zapaženi utjecaj iz točke 3. je manji za IgG nego za ukupne proteine plazme koji su raznorodniji te uključuju i kompleksne razgranatije glikanske strukture.

6. LITERATURA

- Ahn J, Bones J, Yu Y, Rudd PM, Gillar M. Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1,7 μm sorbent. *J Chromatogr B*, 2010, 878, 3-4.
- Alavi A, Axford JS. Glyco-biomarkers: potential determinants of cellular physiology and pathology. *Dis Markers*, 2008, 25, 193-205.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473, 4-8.
- Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 2003, 300, 1524-1525.
- Bieke D, Debby M, Yvan VH. Method development for HILIC assays. *J Sep Sci*, 2008, 31, 1438-1448.
- Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Springer Open Choice*, 2012, 402, 231-247.
- Caffaro CE, Luhn K, Bakker H, Vestweber D, Samuelson J, Berninsone P, Hirschberg CB. A single Caenor-habditis elegans Golgi apparatus-type transporter of UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-N-acetylglucosamine, and UDP-Nacetylglactosamine. *Biochemistry*, 2008, 47, 4337-4344.
- Carbone FR, Gleeson PA. Carbohydrates and antigen recognition by T cells. *Glycobiology*, 1997, 7, 725-730.
- Cathey SS, Leroy JG, Wood T, Eaves K, Simensen RJ, Kudo M, Stevenson RE, Friez MJ. Phenotype and genotype in mucopolidoses II and III alpha/beta: a study of 61 probands. *J Med Genet*, 2010, 47, 38-48.
- Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of plasma samples. *Biochemia Medica*, 2013, 23, 70-77.
- Esko JD, Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71, 435-471.
- Fukuda M, Hiraoka N, Akama TO, Fukuda MN. Carbohydrate-modifying sulfotransferases: structure, function, and pathophysiology. *J Biol Chem*, 2001, 276, 47747-47750.

Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25, 267-278.

Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins-Implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820, 1318-1326.

Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 2007, 446, 1017-1022.

Hoshi H, Shimawaki K, Takegawa Y, Ohyanagi T, Amano M, Hinou H, Nishimura S. Molecular shuttle between extracellular and cytoplasmic space allows for monitoring of GAG biosynthesis in human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820, 1391-1398.

Hu J, Syed ZI, Kazunari H, Nadja CSP, Vilhelm AB. Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (a-OGG1) modulates its function. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33, 3271-3282.

Liu L, Xu YX, Hirschberg CB. The role of nucleotide sugar transporters in development of eukaryotes. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21, 600-608.

Maccioni HJ, Giraudo CG, Danniotti JL. Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. *Neurochem Res*, 2002, 27, 629-636.

Ohtsubo K, Marth J. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 2006, 126, 855-867.

Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*, 2013, 140, 4471-4479.

Pabst M, Altmann F. Glycan analysis by modern instrumental methods. *Proteomics*, 2011, 11, 631-643.

Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, Nabi IR, Wrana JL, Dennis JW. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*, 2004, 306, 120-124.

Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, Simmons CJ, Richardson KB, Page DM, Fukuda M, Varki NM, Marth JD. The ST-3Gal-I sialyltransferase controls CD8⁺ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity*, 2004, 12, 273-283.

Pučić-Baković M, Selman MHJ, Hoffmann M, Rudan I, Campbell H, Deelder AM, Lauc G, Wuhler M. High-Throughput IgG Fc N-glycosylation Profiling by Mass Spectrometry of Glycopeptides. *J Proteome Res*, 2012, 12, 821-31.

Rosen S. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, 129-156.

Schachter H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J*, 2002, 17, 465-483.

Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, 99, 5267-5270.

Shan C, Valerie Q, Xiaoying G, Yong Y, Linda L, Chae R, Chris F, Wendy L, Zhihua JQ, Amy S, Martin V, An S. Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fcγ receptor binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities. *mAbs*, 2012, 4, 326-340.

Shi S, Williams SA, Seppo A, Kurniawan H, Chen W, Ye Z, Marth JD, Stanley P. Inactivation of the Mgat1 gene in oocytes impairs oogenesis, but embryos lacking complex and hybrid N-glycans develop and implant. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 9920-9929.

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J*, 1995, 9, 866-873.

Thierry H. Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation, *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820, 1306-1317.

Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyl-transferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40, 581-616.

Varki A. Nothing in Glycobiology Makes Sense, except in the Light of Evolution. *Cell*, 2006, 126, 841-845.

Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*, 1997, 272, 13997-14000.

Williams SA, Xia L, Cummings RD, McEver RP, Stanley P. Fertilization in mouse does not require terminal galactose or N-acetylglucosamine on the zona pellucida glycans. *J Cell Sci*, 2007, 120, 1341-1349.

Wing DR, Garner B, Hunnam V, Reinkensmeier G, Andersson U, Harvey DJ, Dwek RA, Platt FM, Butters TD. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Ganglioside Carbohydrates at the Picomole Level after Ceramide Glycanase Digestion and Fluorescent Labeling with 2-Aminobenzamide. *Anal Biochem*, 2001, 298, 207-217.

- Wu X, Steet RA, Bohorov O, Bakker J, Newell J, Krieger M, Spaapen L, Kornfeld S, Freeze HH. Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med*, 2004, 10, 518-523.
- Yan A, Lennarz WJ. Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J Biol Chem*, 2005, 280, 3121-3124.
- Yunsheng H. Potential of HILIC-MS in quantitative bioanalysis of drugs and drug metabolites. *J Sep Sci*, 2008, 31, 1481-1491.
- Zachara NE, Hart GW. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1673, 13-28.
- Zhou D, Mattner J, Cantu C, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*, 2004, 306, 1687-1689.

7. SAŽETAK

Glikozilacija je visokospecifičan i reguliran posttranslacijski proces kovalentnog vezanja složenih glikanskih struktura na proteine i lipide, a glikoproteini su uključeni u gotovo sve biološke procese na intracelularnoj i intercelularnoj razini. Predmet istraživanja ovog rada su N-vezani plazmatski glikoproteini sa posebnim fokusom na imunoglobuline G kao iznimno bitne i istraživane glikoproteine.

Imunoglobulini G, plazmatski glikoproteini u posebnom fokusu ovog rada, koji u organizmu djeluju kao protutijela zadužena za obranu organizma od štetnih utjecaja, primjer su glikoproteina odgovornih za prepoznavanje patogena i preživljavanje organizma. N-glikozilacija ima bitnu ulogu u organizmu te bilo kakava neregularnost procesa može dovesti do razvitka bolesti ili letalnog ishoda.

Posljednjih godina provode se velike populacijske studije, cjelogenomske asocijacijske studije i kohortna istraživanja s ciljem identifikacije genske podloge glikozilacije, pronalaženja novih dijagnostičkih glikobiomarkera te općenitog razumijevanja uloge glikozilacije. Ova istraživanja podrazumijevaju upotrebu velikog broja uzoraka iz različitih zemalja te njihov transport, pohranu i višestruke analize. S obzirom na navedeno, od velike je važnosti istražiti kako opetovano zamrzavanje i varijabilni uvjeti tijekom transporta uzoraka, koji često bivaju analizirani i više puta, mogu utjecati na stabilnost glikanskih struktura i rezultate same analize N-glikozilacije. Sa ukupnih proteina plazme, ali i iz plazme izoliranih imunoglobulina G pokidani su N-glikani koji su zatim obilježeni fluorescentim markerom te analizirani tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti bazirane na hidrofilnim interakcijama (UPLC – HILIC). Rezultati analize N-glikozilacije uzoraka ukupnih proteina plazme i imunoglobulina G koji su zamrzavani i odmrzavani tri puta te uzoraka koji su odmrzavani preko noći na sobnoj temperaturi pokazali su najveće odstupanje od ostalih uzoraka koji su odmrzavani brzo jedanput ili dvaput na sobnoj temperaturi ili preko noći, ali na +4°C. Na temelju rezultata se može zaključiti kako ponavljano i dugotrajno odmrzavanje može utjecati na rezultate analize N-glikanskih struktura imunoglobulina G i ostalih plazmatskih proteina. Ovaj utjecaj se nije doduše pokazao velikim, ali za ispitivanje njegove stvarne statističke značajnosti trebalo bi provesti mnogo veće istraživanje.

KLJUČNE RIJEČI: glikozilacija proteina plazme, glikozilacija imunoglobulina G, promjene glikozilacije, utjecaj zamrzavanja i odmrzavanja na glikozilaciju

7. SUMMARY

Glycosylation is a highly specific and delicately regulated posttranslational process of covalent bonding of complex glycan structures and proteins or lipids. Glycoproteins are involved in most intercellular and intracellular biological processes. The topic of this master thesis are N-linked plasma glycoproteins with a focus on immunoglobulin G as an important and widely investigated glycoprotein.

Immunoglobulin G, the plasma glycoprotein in focus of this thesis, is an antibody responsible for the defense of an organism against detrimental influences and survival of said organism. N-glycosylation has an important role in an organism and any irregularity of the process may lead to an illness or even be lethal.

In the last few years, huge population studies, genome wide association studies and cohort studies have been conducted with the goal of identifying genetic foundation of glycosylation, discovering new diagnostic glycobiomarkers and deepening the understanding of glycosylation in general. All these above mentioned studies encompass the repeated analysis of a large number of samples collected from multiple countries, and variable transport and storage conditions. It is of great importance to determine how repeated freeze-thaw cycles and variable transport conditions as well as the reuse of samples affect the stability of plasma glycan structures and the results of N-glycosylation analysis. In this experiment, N-glycans have been removed from the plasma proteins and the previously isolated IgG both of which have undergone different freeze-thaw cycles. Purified N-glycans have been labeled with a fluorescent marker and separated with Hydrophilic interaction ultra performance liquid chromatography (HILIC-UPLC). Samples which had been thawed three times and those which had been defrosted during the night at room temperature, have shown the greatest deviation out of all the other samples which had been defrosted once or twice at room temperature or over night at +4° C . The result of the experiment points to the conclusion that the repeated freeze-thaw cycles and a longer thawing period may have an impact on the glycan structure analysis of immunoglobulin G and other plasma proteins. The effect was not very large so a much larger study should be conducted in order to determine its real statistical significance.

KEY WORDS: plasma proteins glycosylation, immunoglobulin G glycosylation, glycosylation change, impact of freeze-thaw cycles on glycosylation

**UTJECAJ BROJA ODMRZAVANJA I ZAMRZAVANJA TE TEMPERATURE POHRANE
KRVNE PLAZME NA N-GLIKANE UKUPNIH PLAZMATSKIH PROTEINA I
IMUNOGLOBULINA G**

Vedran Bogdanić

SAŽETAK

Glikozilacija je visokospecifičan i reguliran posttranslacijski proces kovalentnog vezanja složenih glikanskih struktura na proteine i lipide, a glikoproteini su uključeni u gotovo sve biološke procese na intracelularnoj i intercelularnoj razini. Predmet istraživanja ovog rada su N-vezani plazmatski glikoproteini s posebnim fokusom na imunoglobulin G kao iznimno važan i istraživani glikoprotein. Posljednjih godina provode se velike populacijske te cjelogenomske asocijacijske studije i kohortna istraživanja s ciljem identifikacije genske podloge glikozilacije, pronalaženja novih dijagnostičkih biljega te općenitog razumijevanja uloge glikozilacije. Ova istraživanja podrazumijevaju upotrebu velikog broja uzoraka iz različitih zemalja te njihov transport, pohranu i višestruke analize. S obzirom na navedeno, od velike je važnosti istražiti kako opetovano zamrzavanje i varijabilni uvjeti tijekom transporta uzoraka, koji često bivaju analizirani i više puta, mogu utjecati na stabilnost glikanskih struktura i rezultate same analize N-glikozilacije. S ukupnih proteina različito zamrzavane plazme, ali i iz takve plazme izoliranog imunoglobulina G, odvojeni su N-glikani koji su zatim fluorescentno obilježeni te analizirani tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti koja se bazira na hidrofilnim interakcijama (UPLC – HILIC). Na temelju rezultata se može zaključiti kako ponavljano i dugotrajno odmrzavanje može utjecati na rezultate analize N-glikanskih struktura imunoglobulina G i ukupnih plazmatskih proteina. Ovaj utjecaj nije velik, ali se povećava drastičnijom manipulacijom uzorcima. Za ispitivanje stvarne statističke značajnosti istraživnog predanalitičkog uvjeta trebalo bi provesti mnogo veće istraživanje.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 8 grafičkih prikaza, 4 tablice i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: glikozilacija proteina plazme, glikozilacija imunoglobulina G, promjene glikozilacije, utjecaj zamrzavanja i odmrzavanja na glikozilaciju

Mentor: **Dr. sc. Olga Gornik**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of biochemistry and molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

IMPACT OF THE NUMBER OF FREEZE-THAW CYCLES AND STORAGE TEMPERATURE OF BLOOD PLASMA ON N-GLYCANS OF PLASMA PROTEINS AND IMMUNOGLOBULIN G

Vedran Bogdanić

SUMMARY

Glycosylation is a highly specific and delicately regulated posttranslational process of covalent bonding of complex glycan structures and proteins or lipids. Glycoproteins are involved in most intercellular and intracellular biological processes. The topic of this master thesis are N-linked plasma glycoproteins with a focus on immunoglobulin G as an important and widely investigated glycoprotein. In the last few years huge population studies, genome wide association studies and cohort studies have been conducted with the goal of identifying genetic foundation of glycosylation, discovering new diagnostic glycomarkers and deepening the understanding of glycosylation in general. All these above mentioned studies encompass the repeated analysis of a large number of samples collected from multiple countries, and variable transport and storage conditions. It is of great importance to determine how repeated freeze-thaw cycles and variable transport conditions as well as the reuse of samples affect the stability of plasma glycan structures and the results of N-glycosylation analysis. In this experiment, N-glycans have been removed from the plasma proteins and the previously isolated IgG both of which have undergone different freeze-thaw cycles. Purified N-glycans have been labeled with a fluorescent marker and separated with Hydrophilic interaction ultra performance liquid chromatography (HILIC-UPLC). The result of the experiment points to the conclusion that the repeated freeze-thaw cycles and a longer thawing period may have an impact on the glycan structure analysis of immunoglobulin G and other plasma proteins. The effect was not very large so a much larger study should be conducted in order to determine its real statistical significance.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 8 figures, 4 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: plasma proteins glycosylation, immunoglobulin G glycosylation, glycosylation change, impact of freeze-thaw cycles on glycosylation

Mentor: **Olga Gornik, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Olga Gornik, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2015.

